

**Aus dem Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung
Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Hans A. Kretzschmar**

**Einzelmolekülanalyse von eiseninduzierten,
porenbildenden α -Synucleinoligomeren:
Von der molekularen Pathologie zur kausalen Therapie**

**Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

**vorgelegt von
Tobias Johannes Högen**

**aus
München**

**Jahr
2009**

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. H.A. Kretzschmar, FRCPATH

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. K. Bötzel

Mitberichtersteller: Prof. Dr. med. M. Kerschensteiner

Prof. Dr. med. P. Bartenstein

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Prof. Dr. med. A. Giese

Dekan:

Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 23.07.2009

Meinen Eltern,
für das Vertrauen, das sie mir geschenkt,
und die Freiheit, die sie mir gegeben haben.

Der Urquell aller technischen Errungenschaften
ist die göttliche Neugier und der Spieltrieb des
bastelnden und grübelnden Forschers und nicht
minder die konstruktive Phantasie des
technischen Erfinders.

Albert Einstein, Berlin, 1930

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1. Neurodegenerative Erkrankungen.....	7
1.2. Synucleinopathien	8
1.3. Das idiopathische Parkinson-Syndrom (Morbus Parkinson).....	8
1.4. α -Synuclein: Eigenschaften, Funktion, Pathophysiologie	12
1.4.1. Synucleinfamilie.....	12
1.4.2. Proteinstruktur	13
1.4.3. Funktionelles Repertoire.....	15
1.4.4. Aggregationsverhalten und Pathophysiologie	18
1.5. Konfokale Einzelmolekülspektroskopie.....	21
1.6. Zielsetzung	24
2. Material und Methoden	26
2.1. Materialien	26
2.2. Proteinexpression	29
2.3. Fluoreszenzmarkierung von α -Synuclein.....	29
2.4. Konfokale Einzelmolekülspektroskopie.....	30
2.4.1. Messaufbau	31
2.4.2. Justage und Messbedingungen.....	32
2.4.3. Analyseverfahren der konfokalen Einzelmolekülspektroskopie	33
2.4.3.1. Autokorrelationsanalyse.....	33
2.4.3.2. Kreuzkorrelationsanalyse.....	36
2.4.3.3. FIDA.....	37
2.4.3.4. SIFT	39
2.5. Proteinase K Verdau.....	40
2.6. Westernblot	41
2.8. Aggregationsansatz.....	42
2.9. Wirkstofftestung	43

2.7. CD-Spektroskopie	43
2.10. Thioflavin T Messungen.....	44
2.12. Rasterkraftmikroskopie (Atomic Force Microscopy).....	44
2.11. Präparation von kleinen unilamellaren Vesikeln	45
2.13. Elektrophysiologie mit planaren Lipid-Bilayer-Membranen	46
2.13.1. Elektrophysiologie - Einzelporenmesstechnik	46
2.13.2. Präparation der α -Synucleinaggregate und Porenbildung	47
3. Ergebnisse	50
3.1. Fluoreszenzmarkierung und Charakterisierung von markiertem α -Synuclein....	50
3.2. Etablierung eines <i>de novo</i> Aggregationsansatzes mit Ethanol als Aggregationsinduktor	52
3.3. Einsatz von Detergenzien und BSA im Aggregationsansatz	55
3.4. CD-Spektroskopie von markiertem und unmarkiertem α -Synuclein	56
3.5. Einsatz von Metallionen.....	58
3.5.1. Metallionenscreening.....	58
3.5.2. FeCl_3 -Effekt auf die Aggregation	60
3.6. Wechsel des Puffersystems	62
3.7. Rasterkraftmikroskopie (AFM) der Intermediat I und II α -Synucleinaggregate ..	63
3.8. Intermediat I und II auf dem Weg zur Amyloidbildung	65
3.9. Porenbildung durch eiseninduzierte Intermediat II Oligomere	67
3.9.1. Untersuchungen zur Porenbildung	67
3.9.2. Inhibition der Intermediat II bedingten Porenbildung	69
3.10. Intermediat I und II als Zielstruktur für eine kausale Therapie	70
3.10.1. Einsatz von DMSO als Aggregationsinduktor	70
3.10.2. SDS-Resistenz von Intermediat II.....	72
3.10.3. Vergleich von Fe^{3+} und Fe^{2+} und der Einsatz von Desferroxamin	73
3.10.4. Wechselwirkung der Intermediat I und II Oligomere mit Lipidvesikeln...	75
3.11. Testung von potentiellen Aggregationsinhibitoren	79

4. Diskussion	82
4.1. Rolle von Proteinaggregaten in der molekularen Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen	82
4.2. Etablierung eines zweistufigen Aggregationsmodells zur Untersuchung der α -Synucleinoligomerisierung auf Einzelmolekülebene	84
4.3. Strukturelle und pathophysiologische Verknüpfungen zu <i>in vivo</i> relevanten Oligomeren	88
4.4. Identifizierung von potentiell kausal therapeutischen Wirksubstanzen	92
5. Zusammenfassung.....	95
6. Abkürzungsverzeichnis	97
7. Abbildungsverzeichnis	99
8. Tabellenverzeichnis	100
9. Literaturverzeichnis	101
10. Lebenslauf	117
11. Danksagung.....	121

1. Einleitung

“Involuntary tremulous motion, with lessened muscular power, in parts not in action and even when supported; with a propensity to bend the trunk forwards, and to pass from a walking to running pace: the senses and intellects being uninjured.“

(James Parkinson, 1817 [152])

1.1. Neurodegenerative Erkrankungen

Im Jahre 1817 beschrieb der englische Arzt James Parkinson in „An Essay on the Shaking Palsy“ die Symptome einer Erkrankung, deren Ätiologie und Pathophysiologie trotz intensiver Forschungsarbeit in den letzten 200 Jahren noch immer nicht vollständig geklärt werden konnten. Durch die Entwicklung und den Einsatz molekularpathologischer Untersuchungsmethoden in den vergangenen Jahrzehnten ist mittlerweile bekannt, dass alle häufigen neurodegenerativen Erkrankungen durch die Bildung und Ablagerung jeweils krankheitsspezifischer, fibrillärer, amyloidartiger Proteinaggregate gekennzeichnet sind. So finden sich beispielsweise bei der häufigsten neurodegenerativen Erkrankung des Menschen, dem Morbus Alzheimer, pathologische extrazelluläre Ablagerungen des Amyloid- β -Peptides und intrazellulär fibrilläre Aggregate des Tau-Proteins. Dagegen stellen sich bei den Prionkrankheiten pathologische Aggregate des Prionproteins, beim Morbus Huntington pathologisch aggregiertes Huntingtin oder beim Morbus Parkinson, bei der Demenz mit Lewy-Körperchen und bei der multiplen Systematrophie pathologische α -Synucleinaggregate als neuropathologisches Charakteristikum dar [2,99,133,166]. In der Pathogenese dieser Erkrankungen scheinen diese Proteinablagerungen bzw. deren Vorstufen, sog. oligomere Aggregationsspezies, eine entscheidende Rolle zu besitzen und die krankheitsassoziierte Nervenzellschädigung zu bedingen [2,19,65,66]. Für die neuropathologische Diagnostik ist der Nachweis pathologischer Proteinaggregate von größter Bedeutung und hat sich zum Goldstandard für die nosologische Klassifikation entwickelt [120]. Mittlerweile finden sich in der Literatur umfangreiche Daten hinsichtlich von Mutationen, biochemischen Modifikationen und Änderungen im Expressionsmuster der beschriebenen Proteine, die zu einer pathologischen Aggregation führen können. Die genauen molekularen und strukturellen Prozesse, die der Aggregatbildung zugrunde liegen, sind jedoch weiterhin nur unzureichend geklärt [178].

1.2. Synucleinopathien

Die Symptome des von James Parkinson beschriebenen Syndroms mit einer Bradykinese, einem Rigor, einem 4-6 Hz Ruhetremor und einer Störung der Stellreflexe sind in ca. 90 % der Fälle durch neurodegenerative Veränderungen bedingt. Die übrigen 10 % lassen sich auf sekundäre Ursachen zurückführen [78]. In Bezug auf die zugrunde liegenden neurodegenerativen Prozesse wird der größte Anteil durch die Synucleinopathien, wie z.B. dem Morbus Parkinson, bedingt. Der Begriff „Synucleinopathie“ umfasst eine Gruppe neurodegenerativer Erkrankungen, die durch fibrilläre, zytoplasmatische α -Synucleinaggregate in bestimmten Neuronenpopulationen oder Gliazellen charakterisiert sind [58,125,181,189]. Zu dieser Gruppe gehören in erster Linie das idiopathische Parkinson-Syndrom (Morbus Parkinson), die multiple Systematrophie (MSA) und die Demenz mit Lewy-Körperchen (DLB) [179]. Zusätzlich schließt die aktuelle Liste der Synucleinopathien u.a. auch die Neurodegeneration mit zerebraler Eisenablagerung Typ I (früher: Hallervorden-Spatz Erkrankung), ferner die diffuse Lewy-Körperchen Erkrankung (engl. „Lewy body disease“, LBD) sowie die Variante der Alzheimerschen Erkrankung mit Lewy-Körperchen ein [79,181]. In allen Synucleinopathien kommen α -Synuclein-positive Einschlüsse in Neuronen bzw. in Gliazellen vor. Neuronale Einschlüsse lassen sich in den Perikarien oder in den Axonen detektieren. Insgesamt gibt es mindestens fünf morphologisch unterscheidbare α -Synuclein-positive Einschlüsse: Lewy-Körperchen (LK) [47], Lewy-Neuriten (LN) [17,33], gliale zytoplasmatische Einschlüsse (engl. „glial cytoplasmic inclusions“, GCI) [150], neuronale zytoplasmatische Einschlüsse [5,140] und axonale Sphäroide [79]. Durch diese neuropathologischen Kennzeichen sind die erwähnten neurodegenerativen Erkrankungen unter dem Begriff „Synucleinopathie“ [59,74,156,182] zusammengefasst.

1.3. Das idiopathische Parkinson-Syndrom (Morbus Parkinson)

Das idiopathische Parkinson-Syndrom, der Morbus Parkinson, ist die häufigste neurodegenerativ bedingte Bewegungsstörung des Menschen [60] und zudem mit ca. 80 % auch die häufigste Erkrankung unter den neurodegenerativen Störungen mit einer Parkinson-Symptomatik [72,78]. Nach dem Morbus Alzheimer ist der Morbus Parkinson die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung des Gehirns [60]. In Bezug auf die Prävalenz liegt eine Vielzahl an Studien vor, die sich in der Methodik aber auch in den untersuchten Populationen mitunter deutlich unterscheiden [170]. Für die Bundesrepublik Deutschland betrug die Prävalenz in einer Studie, die sich auf geriatrische Einrichtungen fokussierte, sogar

12.500 pro 100.000 Menschen [42]. Aktuell geht man in Europa von einer durchschnittlichen Prävalenz von 0,1 bis 0,3 % aus [29,170,198]. Bei der über 65-jährigen Bevölkerung steigt die Prävalenz interessanterweise deutlich an und betrifft je nach Literaturangabe ca. 1 bis 3,5 % der Menschen [30,46,170,198]. Hinsichtlich der Geschlechterpräferenz wird eine geringe männliche Dominanz (1,5:1) beschrieben [96]. Derzeit leiden in Deutschland ca. 250.000 Patienten an Morbus Parkinson [170]. Europaweit wird die Patientenzahl mit bis zu 350.000 und in den USA mit bis zu 500.000 Patienten beschrieben [170]. Insgesamt findet sich der Morbus Parkinson häufiger in Europa und Nordamerika als in Asien [160]. Hinsichtlich der jährlichen Neuerkrankungen variieren die Angaben in der Literatur ebenfalls deutlich. Für Europa wird die Inzidenz zwischen 5 und 346 pro 100.000 Menschen geschätzt [198].

Der Morbus Parkinson ist neuropathologisch durch den fortschreitenden Zelltod bestimmter Nervenzellpopulationen, vor allem neuromelaninhaltiger, dopaminergener Neuronen innerhalb der Substantia nigra pars compacta, charakterisiert [44,105]. Essentiell für die neuropathologische Diagnose sind, neben dem Nervenzellverlust, auch die Beschreibung von zytoplasmatischen, α -Synuclein-positiven, hyalinen Einschlusskörperchen in den vulnerablen Neuronenpopulationen, die sog. Lewy-Körperchen (LK) [105]. Klassische LK stellen sich lichtmikroskopisch in der Hämatoxylin-Eosin Färbung als kugelige, 8-30 μ m große Einschlusskörperchen dar, die eine Cor-Halo-Struktur mit einem hyalinen, eosinophilen Kern besitzen und von einer feinen laminären, ringförmigen Struktur umgeben sind [79]. Die LK bestehen aus ubiquitinierten Proteinen, deren Hauptkomponente das α -Synuclein darstellt [155]. Neben diesen sphärischen, zytoplasmatischen Einschlusskörperchen lassen sich auch in den Neuriten α -Synuclein-positive Ablagerungen, sog. Lewy-Neuriten (LN), detektieren (Abb. 1.1.). Die Verteilung von LK und LN in den verschiedenen Arealen des Gehirns korreliert mit dem Stadium der Erkrankung [16]. So zeigen sich nach der Braak-Klassifikation in der präklinischen Phase die frühesten Einschlüsse im motorischen Kern des Nervus vagus bzw. im Kern des Nervus glossopharyngeus sowie im anterioren olfactorischen Nucleus. Von dort aus „breiten“ sich die LK und LN im Verlauf der Erkrankung innerhalb des Hirnstamms über das Mittelhirn und den entorhinalen Cortex bis in verschiedene neocorticale Gehirnareale aus [16]. Im Gegensatz zu dieser multilokulären Verbreitung pathologischer Einschlusskörperchen betrifft der Neuronenverlust am stärksten die dopaminergen Neurone der Substantia nigra pars compacta.

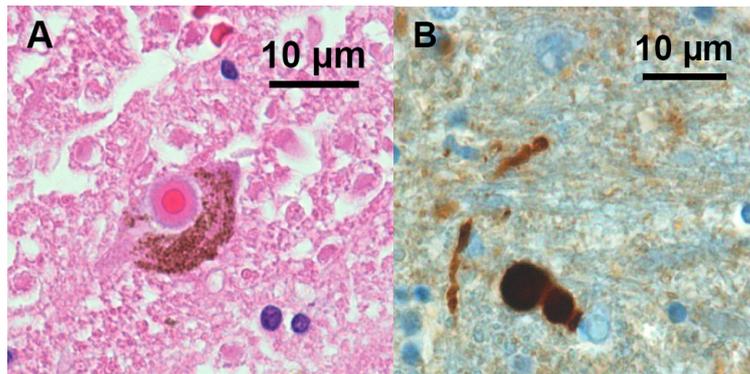


Abb. 1.1. Lewy-Körperchen und Lewy-Neurit im histologischen Bild bei Morbus Parkinson.

A) Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) eines pigmentierten Neurons aus dem Hirnstamm mit einem intrazellulären, zytosolischen Lewy-Körperchen, welches eine deutliche Cor-Halo-Struktur besitzt. B) Immunhistochemische Anfärbung zweier α -Synuclein-positiver Lewy-Körperchen und eines Lewy-Neuriten mit dem Antikörper 15G7 (APAAP Reaktion; Bilder T. Högen, ZNP München).

Durch den Zelluntergang dopaminergener Neurone kommt es zu einem Mangel des Neurotransmitters Dopamin, der physiologisch eine modulierende Rolle im subcortical gelegenen nigro-striatalen Regulationssystem spielt. Pathophysiologisch führt ein Dopaminmangel zu einer Dysfunktion innerhalb der direkten und indirekten sensomotorischen Basalganglienschleife und schlussendlich nach dem Verlust von ca. 50-60 % der dopaminergen Neuronen in der Substantia nigra pars compacta zum klinischen Erscheinungsbild des Morbus Parkinson [8,170]. Die ersten, oft nicht gleich dem Morbus Parkinson zugeschriebenen Krankheitszeichen sind Störungen der Riechfunktion, des Schlafverhaltens, des Vegetativums, oder eine depressive Stimmung [8]. Erst in späteren Stadien entwickeln sich die unter Punkt 1.2. beschriebenen Leitsymptome wie Ruhetremor, Rigor, Brady- bzw. Akinese, eine posturale Instabilität oder auch kognitive Defizite.

Während die neuropathologischen Charakteristika und die für das klinische Erscheinungsbild des Morbus Parkinson verantwortlichen, direkten pathophysiologischen und neurochemischen Ursachen mittlerweile gut erforscht sind, ist der genaue toxische Mechanismus bzw. die Pathophysiologie der dopaminergen Neurodegeneration beim Morbus Parkinson bis heute noch nicht vollständig verstanden. Neben einer direkten Exposition der dopaminergen Nervenzellen gegenüber Neurotoxinen wie MPTP, Herbiziden oder Pestiziden, ist ein weiterer pathophysiologischer Mechanismus der Funktionsverlust bestimmter Genprodukte (engl. „loss of function“). Eine solche Dysfunktion von Genprodukten kann zu einer beschleunigten, altersabhängigen Degeneration von Nervenzellen führen [200].

Dies betrifft die ca. 5 % der Parkinson Patienten, bei denen sich eine familiäre Häufung findet. Für diese familiären (monogenetischen) Formen des Morbus Parkinson wurden bisher 13 verschiedene mit Morbus Parkinson assoziierte Gen-Loci beschrieben (Park 2 bis Park 13 mit den bereits identifizierten Genen für Park 2, 5, 6, 7, 8, 9 und 13) [49,50,132,200]. Veränderungen innerhalb dieser Genorte, z.B. in Form von Mutationen oder Deletionen, resultieren in einer Dysfunktion zellulärer Systeme, wie Proteasomen oder Mitochondrien, oder einer Störung innerhalb bestimmter (intrazellulärer) Signalwege. Diese Funktionsverluste bedingen bzw. fördern den Nervenzelluntergang z.B. durch oxidativen Stress, durch einen Mangel an Energieträgern oder durch einen gestörten Proteinabbau [200]. Die familiären oder neurotoxinbedingten Formen des Morbus Parkinson zählen nicht zum Formenkreis des idiopathischen bzw. sporadischen Morbus Parkinson, da sie mitunter andere neuropathologische Charakteristika bei gleichem klinischem Phänotyp aufzeigen. Dennoch haben die Erkenntnisse über diese hereditären bzw. toxischen Ursachen in der Vergangenheit dazu beigetragen, die Pathogenese und Pathophysiologie des idiopathischen Morbus Parkinson hinsichtlich der Beeinträchtigung von Zellsystemen oder Signalwegen besser zu verstehen. Neben der „loss of function“ gibt es aber noch mindestens ein weiteres pathophysiologisches Prinzip im Rahmen der neurodegenerativen Erkrankungsmechanismen, welches auch für den Morbus Parkinson zutrifft. Dieses ist dadurch charakterisiert, dass ein Gen bzw. Genprodukt sich unter bestimmten Umständen verändert und somit einen neurotoxischen Effekt hinzugewinnt (engl. „gain of toxic function“) [200]. Diese Eigenschaft wird dem Park1-Genprodukt, dem α -Synuclein, zugeschrieben. Nach der Entdeckung dieses Proteins im Jahr 1993 (vgl. Einleitung 1.4.1.) waren die Hinweise dafür, dass α -Synuclein eine zentrale Rolle in der Pathogenese des Morbus Parkinson darstellt, der Nachweis von Punktmutationen im α -Synucleingens bei Familien, die von einer autosomal-dominant vererbten Variante des Morbus Parkinson betroffen waren [102,156]. Zudem wurde α -Synuclein als die Hauptkomponente der LK und der LN identifiziert. Bis heute wurden drei verschiedene Punktmutationen innerhalb des α -Synucleingens beschrieben [102,156,207]. Ein weiterer Beleg für die fundamentale Rolle des α -Synucleins in der Pathogenese des Morbus Parkinson ging mit der Entdeckung bei Parkinson Patienten einher, dass auch eine höhere Gendosis bedingt durch eine Duplikation bzw. Triplikation des α -Synucleingens die Erkrankung auslösen kann [21,73,176]. Durch die kontinuierliche molekulare Erforschung der idiopathischen Morbus Parkinson Fälle (95 %), die alle eine α -Synuclein-positive Pathologie in Form von LK und LN besitzen, zusammen mit den hereditären Morbus Parkinson Fällen

(5 %), die z.T. keine α -Synuclein-abhängige Pathologie zeigen, ist in der Vergangenheit das Verständnis für die pathogenetischen bzw. toxischen Mechanismen des Morbus Parkinson deutlich gewachsen (vgl. Einleitung 1.4.).

1.4. α -Synuclein: Eigenschaften, Funktion, Pathophysiologie

1.4.1. Synucleinfamilie

Das humane α -Synuclein ist mit 140 Aminosäuren ein ca. 14 kDa schweres, gut lösliches und im nativen Zustand ungefaltetes Protein, welches zur Synucleinproteinfamilie gehört. Diese Proteinfamilie umfasst beim Menschen drei verschiedene Genprodukte, die auf den Chromosomen 4q21 (α -Synuclein), 5q35 (β -Synuclein), 10q23 (γ -Synuclein) kodiert sind [77,110,156,180]. Zusätzlich gibt es noch ein entferntes Familienmitglied, das Retina-spezifische Synoretin [183]. Die drei Mitglieder α -, β - und γ -Synuclein sind zwischen 127 und 140 Aminosäuren lang und zu 55-62 % identisch in ihrer Aminosäuresequenz [59,109]. α -Synuclein wurde erstmals 1988 aus präsynaptischen Nervenendigungen innerhalb des elektrischen Organs des kalifornischen Zitterrochens (*Torpedo californica*) isoliert. Dort wurde es mit cholinergen, synaptischen Vesikeln assoziiert beschrieben [124]. Durch die eindeutige Lokalisation in den präsynaptischen Nervenendigungen und einem scheinbaren Vorkommen in Teilen der nukleären Hülle erhielt das Protein seinen Namen – Synuclein. Im Gegensatz zur zytoplasmatischen Lokalisation in den Synapsen konnte in nachfolgenden Studien das nukleäre Vorkommen des α -Synucleins nicht mehr bestätigt werden, dennoch blieb der Name [60,77,126].

Die allerersten Anzeichen dafür, dass α -Synuclein mit neurodegenerativen Erkrankungen in Verbindung steht, lieferten die Ergebnisse von Ueda *et al.*, die bei der biochemischen Analyse amyloider Plaques von Alzheimer Patienten ein Peptid von 35 Aminosäuren entdeckten, welches keine Gemeinsamkeit mit β -Amyloid zeigte und daraufhin als „non-amyloid beta component of AD amyloid plaques“ (nicht-Amyloid-Beta Komponente, NAC Peptid) benannt wurde [190]. Das Mutterprotein dieses NAC Peptids wurde konsekutiv „non-amyloid beta component precursor“ (Vorläufer der nicht-Amyloid-Beta Komponente, NACP) genannt. Kurze Zeit darauf wurde im Rahmen von Antikörperstudien gegen gepaarte, helicale Filamente, die aus Gehirnen von Alzheimer Patienten präpariert worden waren, sowohl das NACP-Mutterprotein als α -Synuclein sowie ein weiteres Protein, das Phosphoneuroprotein-14, als β -Synuclein identifiziert [77]. Im Jahre 1997 beschrieben Ji *et al.* eine Proteinsequenz, welche übermäßig stark im menschlichen Brustdrüsenkrebsgewebe exprimiert wurde.

Zunächst bezeichnete man das dazugehörige Gen als „breast cancer specific gene 1 (BCSG1)“ [82]. Auf Grund der großen Ähnlichkeit und der ausgeprägten Sequenzgleichheit mit α - und β -Synuclein wurde dieses Protein jedoch in γ -Synuclein umbenannt [59,109]. Alle Mitglieder der Synucleinfamilie (α -, β -, γ -Synuclein) werden in hohem Maße im zentralnervösen Nervensystem exprimiert. In geringerem Maße sind sie aber auch in anderen Organen wie Pankreas, Niere, Lunge oder Skelettmuskel zu finden [76,109,138]. Die Detektion des α -Synucleins als zentrale Komponente in neuronalen (LK, LN) und glialen (GCI) Einschlusskörperchen (vgl. Einleitung 1.2.) ließ das Protein bzw. die Proteinfamilie in den letzten 15 Jahren zu einem äußerst attraktiven Gegenstand neurowissenschaftlicher Forschung gedeihen.

1.4.2. Proteinstruktur

α -Synuclein findet sich reichlich im zentralen Nervensystem. Dort stellt es ca. 0,5-1 % des gesamten zytoplasmatischen Proteingehalts dar [76]. Nach den Ergebnissen des Erstbeschreibers Ueda *et al.* machten auch Nachfolgestudien eine Ko-Lokalisation des α -Synucleins mit synaptosomalen Membranen bzw. mit synaptischen Vesikeln ausfindig [75,81,84]. Bedingt durch alternatives Splicing sind bisher drei humane Isoformen beschrieben worden. Neben den zwei Isoformen α -Synuclein-126 (Deletion Exon 3, AS 41-54) und α -Synuclein-112 (Deletion Exon 5, AS 103-130), ist das Volllängenprodukt α -Synuclein-140 die bekannteste Isoform [13]. Letztere lässt sich in drei Abschnitte, die N-terminale Region, die NAC-Region und die C-terminale Region, gliedern:

(i) Die N-terminale Region, welche die Aminosäuren 1-60 umfasst, ist durch vier unvollständige, 11 Aminosäure lange Wiederholungssequenzen mit dem hexamerischen Konsensusmotiv KTKEGV charakterisiert. Dieses Motiv findet sich zusätzlich im Übergang der N-terminalen zur NAC-Region, sowie ein weiteres Mal in der NAC-Domäne (AS 61-95) selbst. In Gegenwart von negativ geladenen Lipid-Wasser-Grenzflächen, z.B. von Phospholipidvesikeln oder Membranen, ändert sich die Konformation der N-terminalen Domäne des α -Synucleins. Aus einer ungeordneten Sekundärstruktur entstehen dabei zwei amphipatische α -Helices, vergleichbar mit Lipidbindungsdomänen von Apolipoproteinen [28]. In der N-terminalen Domäne finden sich zudem mit A30P, A53T und E46K alle bisher beschriebenen Punktmutationen des α -Synucleingens, die mit einer hereditären Form des Morbus Parkinson assoziiert sind [102,156,207].

(ii) Die zentrale Region, mit den Aminosäuren 61-95, stellt eine durch hydrophobe Aminosäuren charakterisierte Domäne dar, die ursprünglich als die „nicht amyloid-beta Komponente (NAC)“ in Alzheimerplaques beschrieben wurde [184,190]. Dass die NAC-Domänensequenz im Aggregationsverhalten des Proteins eine erhebliche Rolle spielt und den hoch-amyloidogenen, β -faltblattfördernden Anteil darstellt, zeigen Aggregationsversuche im Vergleich mit β -Synuclein. Das Homolog, das sich von α -Synuclein durch das Fehlen von 11 Aminosäuren innerhalb der spezifischen zentralen hydrophoben NAC-Sequenz (AS 73-83) unterscheidet und nicht in Lewy-Körperchen zu finden ist, zeigt keine Tendenz zur Selbstaggregation in vitro [83].

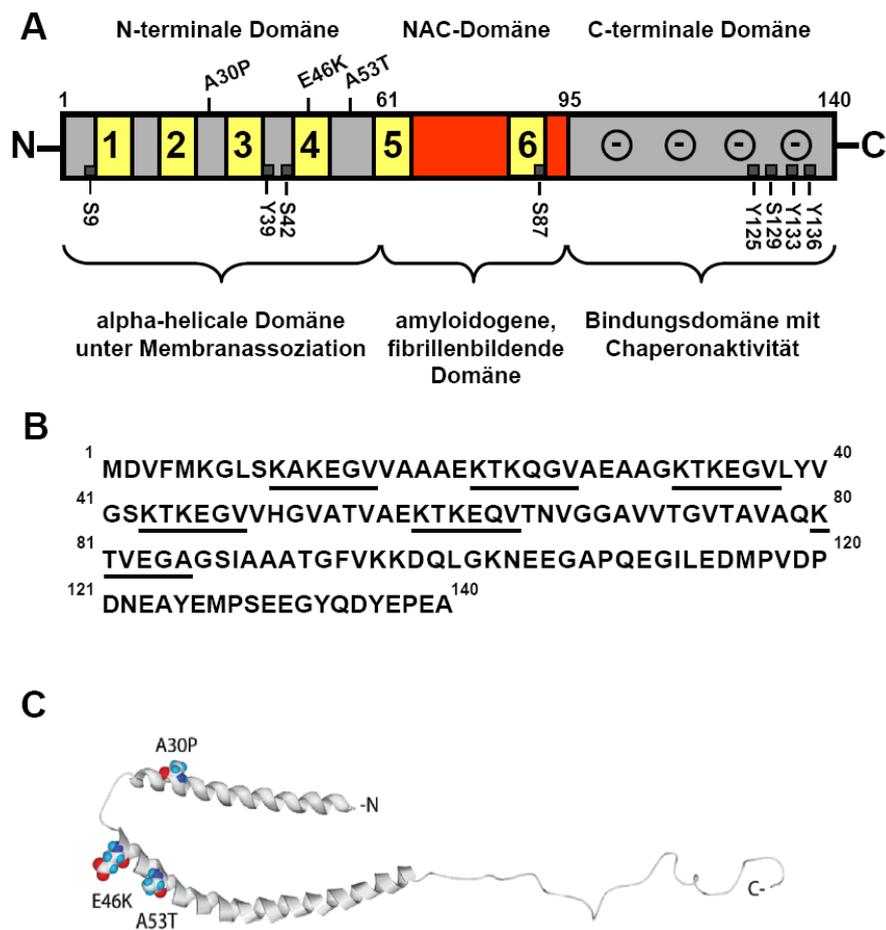


Abb. 1.2. Schematische Darstellung der humanen α -Synucleindomänen und der Proteinsequenz.

A) Die unvollständigen KTKEGV-Wiederholungssequenzen sind gelb unterlegt und durchnummeriert. Die N-terminale Domäne ist der Sitz aller bisher bekannten Parkinson-assoziierten Mutationen. Zudem sind die rot unterlegte NAC-Domäne und der negativ geladene C-Terminus sowie die potentiell funktionsbeeinflussenden Phosphorylierungs- bzw. Nitrierungsstellen an den Serin- bzw. Tyrosinresten dargestellt (Nach Kahle 2002, Rechia 2004 und Beyer 2007 [14,83,161]). B) Aminosäuresequenz des α -Synucleins mit den unterstrichenen Wiederholungssequenzen. C) Dreidimensionale Darstellung des α -Synucleins mit den beiden membranassoziierten, N-terminalen α -Helices und der sperrigen

Versuche der letzten Jahre ergaben sogar, dass die Interaktion von α -Synuclein und β -Synuclein die Formation von Aggregaten inhibieren kann [52,151,194]. Auch γ -Synuclein weist u.a. im zentralen Domänenbereich eine veränderte Aminosäuresequenz auf und besitzt nur eine schwache Fähigkeit, amyloidartige, fibrilläre Ablagerungen zu bilden [173,194]. Die fibrillen- und amyloidbildende Eigenschaft des α -Synucleins ist möglicherweise bedingt durch eine spezielle, 11 Aminosäure lange (AS 72-83), hydrophobe Peptidsequenz der zentralen NAC-Domäne. Dies ist auch dadurch belegt, dass die NAC-Domänensequenz zum Einen allein bzw. im Ansatz mit α -Synuclein-140 die Fibrillenbildung induzieren kann und zum Anderen durch einen mutationsbedingten Austausch dieser hydrophoben Aminosäuren in hydrophile Aminosäuren oder durch eine Deletion dieses Abschnitts die Aggregationstendenz verloren geht [51]. Interessanterweise liefert der Aminosäuresequenzvergleich der α -Synuclein-NAC-Domäne mit amyloidogenen Proteinen anderer neurodegenerativer Erkrankungen eine entscheidende Gemeinsamkeit. Während α -Synuclein in der NAC-Domäne die Sequenz „VGGAVVTG“ (AS 66-73) zeigt, besitzen A β bzw. das Prionprotein mit „VGGVVIAT“ (AS 36-42) bzw. „AAGAVVGG“ (AS 117-124) eine Art Konsensussequenz [187].

(iii) Die C-terminale Region mit den Aminosäuren 96-140 ist durch zahlreiche saure Aminosäurenreste bei physiologischem pH negativ geladen. Mit den Aminosäuren Tyrosin an den Positionen 125, 133, 136 und Serin an 129 besitzt α -Synuclein zudem potentiell funktionsbeeinflussende bzw. aggregationsbeeinflussende Phosphorylierungs- und Nitrierungsstellen [85,144,158,195]. Die Rolle der C-terminalen Region im Aggregationsverhalten des α -Synucleins wird unterschiedlich diskutiert. Einerseits gibt es Hinweise, dass C-terminal trunkiertes α -Synuclein eine deutlich stärkere Aggregationsneigung besitzt [127], andererseits weisen Studien darauf hin, dass der negativ geladene C-Terminus insbesondere bei metallionenabhängigen Aggregationsprozessen involviert ist [146,148,193].

1.4.3. Funktionelles Repertoire

Trotz intensiver Forschung sind bis heute noch nicht alle Zusammenhänge bezüglich der physiologischen Funktion des α -Synucleins abschließend geklärt. In der gegenwärtigen Literatur umfasst das diskutierte funktionelle Repertoire v.a. den Kreislauf und Transport synaptischer Vesikel (i), die Interaktion mit Membranen und Lipiden (ii) sowie die Wechselwirkung mit anderen zytosolischen und membrangebundenen Proteinen (iii):

(i) Innerhalb präsynaptischer Nervenendigungen existiert monomeres α -Synuclein in einem Gleichgewicht zwischen einer freien und einer vesikel- bzw. plasmamembrangebundenen Funktionsform. Dabei sind ca. 15 % des α -Synucleins membrangebunden [113,128]. Diese unmittelbare Interaktion legt nahe, dass α -Synuclein die Bildung, die Speicherung, den Umsatz und die Transmitterfreisetzung synaptischer, katecholinerger (z.B. dopaminhaltiger) Vesikel reguliert und somit in die synaptische Übertragungsfunktion eingebunden ist [22,28,119,203]. Im Prozess der Vesikelfreisetzung (Exozytose) konnte gezeigt werden, dass eine übermäßige α -Synucleinexpression die Anlagerungs- und Verschmelzungsschritte der präsynaptischen Vesikel mit der Plasmamembran behindern kann [106]. Wird in reifen Synapsen dagegen der α -Synucleingehalt via Antisense-Oligonukleotiden herunterreguliert, vermindert sich auch die Anzahl synaptischer Vesikel in der Präsynapse, die nicht direkt an die präsynaptische Membran gebunden sind [137]. Ferner bedingt der kontrollierte Verlust des α -Synucleins im transgenen Mausmodell (engl. „knockout“) eine gesteigerte Freisetzung von Dopamin im Striatum, wenn striatale Neurone elektrisch gereizt werden. Dies deutet auf eine aktivitätsabhängige, negativ-regulatorische Funktion des α -Synucleins innerhalb der striatalen Neurotransmission hin [1]. Zudem ist α -Synuclein in der Lage, sich an präsynaptische Dopamintransporter zu binden und durch eine Translokation des Transporters an die Zelloberfläche die Dopaminaufnahme wiederum zu fördern [112].

(ii) α -Synuclein beeinflusst aber nicht nur die synaptische Funktion, sondern möglicherweise auch die (synaptische) Membranorganisation. Sowohl bei der Überexpression in neuronalen Zellen, als auch bei homozygoten Deletionen des α -Synucleins *in vivo* konnten Veränderungen der Membranfluidität, der zellulären Fettsäureaufnahme sowie des Fettsäuremetabolismus beobachtet werden [191]. Unter Ausbildung einer N-terminalen, α -helicalen Sekundärstruktur interagiert monomeres α -Synuclein stabil mit verschiedenen Phospholipidmembranen, zudem mit synthetisch hergestellten, stark gekrümmten, im „gel-state“ befindlichen Phospholipidvesikeln (z.B. Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin, DPPC), mit negativ geladenen Phospholipidvesikeln (Palmitoyl-Oleyl-Phosphatidylserin, POPS), ferner mit Fettsäuren, Detergensmicellen, zellulären Membranen und mit Lipidrafts [14,191]. Daher wird als weitere potentielle Funktion des α -Synucleins die Stabilisierung von Membranen und die Regulierung des Vesikelpools angenommen [14,28,87,141,191]. Zuletzt sei in diesem Zusammenhang auch die Tatsache erwähnt, dass monomeres, membrangebundenes α -Synuclein die Lipidoxidation reduzieren kann und somit protektiv wirkt [211]. Im Gegensatz zu den beschriebenen Schutzfunktionen gibt es aber auch Vermutungen dahingehend, dass

Lipidvesikel die Formation oligomerer Aggregate fördern und bestimmte Vesikel diese Aggregatspezies sogar besser binden können als Monomere [14]. Dies schließt vor allem Vesikel ein, die sich *in vitro* bzw. *in vivo* überwiegend aus POPC-Lipiden (Palmitoyl-Oleoyl-Phosphatidylcholin) zusammensetzen und die sich ohne Membrandefekte im fluiden, flüssig-kristallinen Zustand befinden. Auch Zellorganellen sind unter diesem Gesichtspunkt sehr interessant. So besitzen z.B. Mitochondrien oder das endoplasmatische Retikulum in ihren biologischen Membranen bis zu 38-46 % zwitterionische PC-Lipidstrukturen (Phosphatidylcholin) [35]. Insgesamt ist die Bindung von Aggregaten an verschiedene Vesikelspezies bzw. Lipidmembranen bis heute jedoch noch unzureichend untersucht.

(iii) In Bezug auf die Interaktion von α -Synuclein mit Proteinen und anderen potentiellen Liganden sind weit mehr als 50 Bindungspartner beschrieben [31]. In Einklang mit dem synaptischen Einfluss bzw. mit dem Effekt auf Lipidmembranen wurden α -Synuclein, aber auch sein Homolog β -Synuclein, als hoch affine Inhibitoren der Phospholipase D2 (PLD2) beschrieben. Die nahe der Plasmamembran lokalisierte PLD2 ist durch die Hydrolyse von Phosphatidylcholin in die sekundären Botenstoffe Phosphatidylsäure und Cholin in signalinduzierte, zytoskelettale Regulationsmechanismen sowie in Endozytosevorgänge involviert [59,80]. In diesem Zusammenhang spielt auch die Phosphorylierung von α -Synuclein eine entscheidende Rolle. Durch verschiedene Kinasen, wie Casein Kinase I oder G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen, wird durch Phosphorylierung an Serin-129 die Fähigkeit des α -Synucleins, mit Phospholipiden und Lipasen zu interagieren, vermindert [144,158]. Dies ergänzt das Bild eines regulativen Effekts bei der Biosynthese von (synaptischen) Membranen und des Einflusses auf den synaptischen Vesikelkreislauf. Interessanterweise teilt sich α -Synuclein eine 40-prozentige Übereinstimmung in der N-terminalen Aminosäuresequenz mit dem Chaperone 14-3-3. Dies legt den Schluss nahe, dass α -Synuclein auch eine Chaperonefunktion besitzt [145]. Während jedoch das zytosolische 14-3-3 Protein durch die Antagonisierung von BAD (Bcl-2-associated death promoter), einem proapoptotischen Mitglied der BCL2-Familie, die Apoptose von (Nerven-)Zellen verhindern kann, wurde für α -Synuclein eine zelltoxische Wirkung diskutiert. Durch die Interaktion von α -Synuclein mit 14-3-3 könnte unter Ausbildung eines Proteinkomplexes der anti-apoptotische Faktor 14-3-3 sequestriert und somit der Zelltod gefördert werden [161]. Im Gegensatz dazu wurde α -Synuclein aber auch eine Hilfs-Chaperone Fähigkeit zugeschrieben, welche die Nervenendigungen bei Schädigung im Cystein-Strang-Protein(CSP α)-SNARE-Signalweg zu schützen vermag. Dieser Signalweg agiert an der präsynaptischen Membran im

Rahmen der Vesikelfreisetzung. Interessanterweise konnte an CSP α -defizienten Mäusen die transgene Expression von α -Synuclein sowohl die Letalität als auch die progressive Neurodegeneration vermindern. Es ist davon auszugehen, dass α -Synuclein das CSP α dabei nicht einfach ersetzt, sondern vielmehr „Downstream“ in der Regulation und im Zusammenbau von SNARE-Komplexen wirkt, welche wiederum für die Vesikelfreisetzung essentiell sind [20]. Eine weitere Schutzfunktion ist mit der inhibierenden Interaktion von α -Synuclein und der c-jun N-terminalen Kinase, einem Protein der Mitogen-aktivierten Proteinkinasefamilie, gegen oxidativen Stress beschrieben [68]. Letztendlich jedoch sind der Stellenwert und die funktionelle Konsequenz aller Interaktionen *in vivo* noch längst nicht abschließend geklärt. Vielmehr stellt sich eine entscheidende Frage:

Wie kann dieses kleine, nativ ungefaltete Protein mit einem solch breiten und doch unklaren physiologischen Spektrum eine Erkrankung wie Morbus Parkinson triggern bzw. auslösen?

1.4.4. Aggregationsverhalten und Pathophysiologie

Entscheidend für die Entstehung von pathologischen, lichtmikroskopisch sichtbaren, amyloidartigen Aggregaten im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen ist die Zusammenlagerung von Einzelmolekülen, sog. Monomeren, in fibrilläre Aggregate. Dieser Vorgang der Aggregation läuft nach neueren wissenschaftlichen Erkenntnissen über kleinere, sog. intermediäre Aggregate ab, die in der Literatur als Oligomere, Protofibrillen und Protofilamente bezeichnet werden (Abb.1.3.) [3,25,45,61,94,168,197]. Die genaue molekularpathologische Ursache der Neurodegeneration des Morbus Parkinson ist immer noch unzureichend geklärt. Es wird jedoch angenommen, dass kleine Oligomere die wesentliche toxische Spezies darstellen und nicht fibrilläre, amyloidartige α -Synucleinablagerungen [65,94,200]. Nach dieser Hypothese würden eventuell große, intrazelluläre Proteinablagerungen, wie z.B. die LK oder LN, vielmehr einen Ausweg der lebenden Zelle darstellen, die toxische Spezies zu sequestrieren und zelluläre Schäden zu vermindern. Allerdings stellen auch diese großen amyloiden Proteinablagerungen eine Gefahr dar, weil sich möglicherweise kleine oligomere Fragmente aus dem Verbund herauslösen können. Diese könnten einerseits als selbständige, potentiell toxische Komponenten fungieren und andererseits als Aggregationskeime dienen, an denen sich wiederum Monomere anlagern und die dann zu neuen Aggregaten (größeren oligomeren Spezies, LK oder LN) weiterreagieren können (engl. „seeding“) [65,201]. Ein bekannter Aspekt ist auch, dass die Überexpression von humanen α -Synuclein nicht nur die Apoptose von Zellen auslösen kann

(z.B. via 14-3-3, vgl. Einleitung 1.4.3.), sondern auch Zellorganellen schädigen und die Anfälligkeit für oxidativen Stress unabhängig von detektierbaren, fibrillären Proteinablagerungen erhöhen kann [63]. Hinsichtlich oligomerer Strukturen konnte gezeigt werden, dass bestimmte lösliche α -Synucleinoligomere strukturelle Gemeinsamkeiten mit anderen amyloidbildungsfähigen Oligomeren besitzen, beispielsweise bestehend aus dem Amyloid- β Peptid oder dem Prionprotein. Diese Ergebnisse implizieren einen gemeinsamen Mechanismus hinsichtlich der Pathogenese verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen [18,94]. Zwei mögliche Mechanismen sind hier zu erwähnen: Erstens könnten die toxischen Oligomere durch Einlagerung in Lipidmembranen zu einer Porenbildung führen und somit durch die Permeabilisation von Zellmembranen, Zellorganellen oder Vesikeln zu einer Dysfunktion der Zellen bzw. Organellen beitragen [95,196,197]. Zweitens besteht die Gefahr, dass oligomere Aggregatspezies mit dem Proteasomensystem interagieren und es durch Hemmung des regulären Proteinabbaus zu einer Akkumulation verschiedener Proteine bzw. Spaltprodukte in der Zelle kommt. Eine solche Hemmung trüge dann auch zu einem erhöhten oxidativen Stress innerhalb der Zelle bei [118,185]. Ausgehend von Proteinmonomeren und mündend in Amyloidfibrillen wurden im Verlauf von Aggregationsprozessen bereits diverse intermediäre, globuläre Oligomerspezies oder Protofibrillen diskutiert [45,57,94,192]. Zusätzlich konnten einige Forschungsgruppen krankheitsspezifische α -Synucleinoligomere bei Patienten mit Morbus Parkinson oder MSA nachweisen, welche oligomere, ringförmige bzw. porenähnliche Strukturen erkennen ließen [40,157,175]. Bislang ist jedoch weder bekannt, welche Oligomerspezies die toxische, nervenzellzerstörende Eigenschaft besitzt, noch existiert ein einheitliches *in vitro* bzw. *in vivo* Modell, um diese Prozesse effizient unter molekularpathologischen und therapeutischen Gesichtspunkten zu untersuchen.

Epidemiologische Studien ließen einen Einfluss von Schwermetallionen in Bezug auf die Ätiologie des Morbus Parkinson erkennen [62,208]. Insbesondere Eisenionen könnten eine entscheidende Rolle in der Pathogenese des Morbus Parkinson spielen. Diejenigen Neurone, die am stärksten bei Parkinson Patienten betroffen sind, liegen in der Substantia nigra und im Locus coeruleus des Hirnstamms. Diese Hirnregionen sind besonders reich an Neuromelanin, welches reaktive Metallionen, vor allem Eisenionen, bindet und sequestriert. Bei Parkinson Patienten konnte eine Korrelation zwischen erhöhtem Eisenspiegel und dem Schweregrad der neuropathologischen Veränderungen beobachtet werden [64]. Ferner wurden im Rahmen von *post mortem* Studien in LK signifikant erhöhte Spiegel von dreiwertigen Eisenionen (Fe^{3+}) gefunden – im Vergleich zu zweiwertigen Fe^{2+} -Ionen [48].

Veränderungen im Eisenmetabolismus, assoziiert mit einer gesteigerten Eisenablagerung, sind nach Untersuchungsergebnissen mit bildgebenden Verfahren, wie dem transcraniellen Ultraschall oder der Magnetresonanztomographie, bereits frühzeitig zu detektieren. Diese Veränderungen gehen offenbar dem Verlust dopaminerger Neurone voraus, was suggeriert, dass es sich um ein frühes Geschehen bei Patienten handelt, die mit dem Risiko behaftet sind Morbus Parkinson zu entwickeln [10,131,142,186]. Der Eisenspeicher in der Substantia nigra macht ca. 10-20 % des gesamten zerebralen Eisenpools aus. Nach den ersten Lebensjahren steigt der Eisenspiegel in der Substantia nigra bis zum 40. Lebensjahr von 20 ng/mg auf über 200 ng/mg und bleibt bis ins hohe Alter auf diesem Niveau stabil [48]. Bei Morbus Parkinson Patienten erhöht sich die Eisenkonzentration in der Substantia Nigra pars compacta zusätzlich um bis zu 30-35 %. Interessanterweise zeigte der Einsatz von Eisenchelatoren eine neuroprotektive Wirkung gegenüber der Neurodegeneration innerhalb der Substantia nigra in Modellsystemen, die einen Neuronenverlust durch eine Proteasomeninhibition oder durch eine Behandlung mit MPTP bzw. 6-Hydroxydopamin verursachten [91,174,210]. Auf molekularer Ebene konnte nachgewiesen werden, dass Metallionen, wie Eisen oder Aluminium, *in vitro* die Bildung oligomerer α -Synucleinaggregate und die Entstehung von Amyloidfibrillen triggern bzw. beschleunigen [193]. Gleichzeitig induzieren Metallionen die Formation intrazellulärer α -Synucleinaggregate [67,146]. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Metallionen, insbesondere Eisenionen, möglicherweise eine entscheidende Rolle in der Entstehung von α -Synucleinaggregaten spielen und den Krankheitsverlauf von Morbus Parkinson deutlich beeinflussen können. Die genauen molekularen Prozesse und Zusammenhänge der α -Synucleinaggregation bzw. der Bildung verschiedener Oligomerspezies, welche eine toxische Eigenschaft besitzen, sind bis dato noch unzureichend geklärt. Diskutiert werden, neben einer metallionenabhängigen Verminderung der elektrostatischen Abstoßung und somit einer erhöhten Aggregationstendenz der α -Synucleinmonomere, vor allem ein metallioneninduzierter oxidativer Stress, der kritische biologische Strukturen sowie Zellmembranen und -organellen negativ beeinflussen kann (Abb. 1.3.) [48,127,148,162].

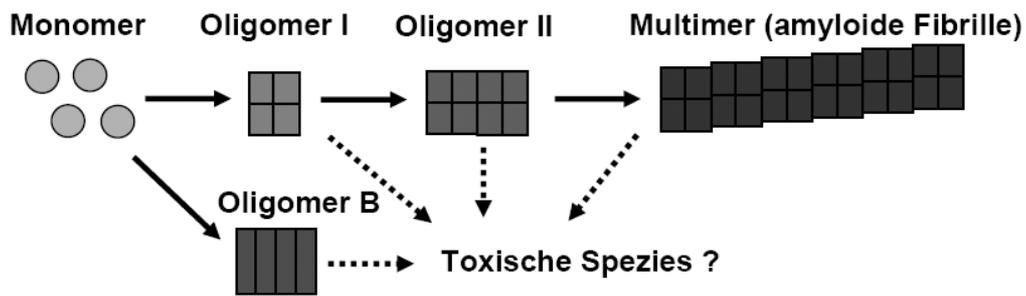


Abb. 1.3. Neurodegenerative Erkrankungen, wie Morbus Parkinson, zeichnen sich durch die Bildung und Ablagerung verschiedener pathologischer Aggregatspezies aus. Oligomere Zwischenstufen werden als die wesentliche toxische Spezies angenommen.

Auf Grund der zahlreichen noch zu klärenden Fragen und der Tatsache, dass durch die demographische Entwicklung in Deutschland und Europa auch zukünftig mit einem Anstieg der Prävalenz des Morbus Parkinson zu rechnen ist [29], bietet dieses Forschungsgebiet eine große Herausforderung. Dies ist auch unter dem Gesichtspunkt zu betrachten, dass es bis heute noch keine kausale Therapie für den Morbus Parkinson und nahezu alle anderen neurodegenerativen Erkrankungen gibt. Die aktuelle wissenschaftliche Hypothese, dass kleine oligomere Aggregate als die toxische Spezies angenommen werden, suggeriert diese oligomeren Strukturen zur therapeutischen Zielstruktur. Um jedoch die Aggregationsprozesse zu verstehen und dann therapeutisch einzugreifen, ist es primär notwendig, diese Prozesse in einem Modell messen zu können. Als zentrale Methode, einen solchen Ansatz zu entwickeln und im Folgenden sowohl hinsichtlich der physiologischen Relevanz als auch im Rahmen einer Therapieentwicklung zu nutzen, bietet sich die konfokale Einzelmolekülspektroskopie an.

1.5. Konfokale Einzelmolekülspektroskopie

Bereits vor mehr als 30 Jahren ist das theoretisch-analytische Konzept der fluoreszenzbasierten Einzelmolekülspektroskopie zur Untersuchung chemischer Reaktionen und der Messung von Diffusionsprozessen entwickelt worden [4,36,37,122,123]. Die praktische Anwendung zur Analyse einzelner Moleküle wurde jedoch erst durch die Entwicklung und Einführung des konfokalen Aufbaus der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie ermöglicht (engl. „fluorescence correlation spectroscopy“, FCS) [38,164]. Diese erlaubt es, Moleküle anhand ihrer Fluoreszenzemission zu charakterisieren. In den letzten 15 Jahren hat sich die FCS zunehmend als die Methode zur Untersuchung dynamischer Prozesse bei kleinsten, d.h. submikromolaren Konzentrationen etabliert [171]. Das

Grundprinzip der FCS-Methode beruht auf Messung und Analyse von Signalfluktuationsen einer kleinen Anzahl von Molekülen in einem bestimmten Fokussmessvolumen. Die technische Umsetzung erfolgt dadurch, dass in einem konfokalen Mikroskop das Licht eines Anregungslasers durch ein Objektiv mit hoher numerischer Apertur in einem Fokusvolumen von ca. 10^{-15} Liter (1 fl), entsprechend einem Durchmesser von weniger als 1 μm , gebündelt wird. Die sich im Fokusvolumen befindlichen fluoreszenzmarkierten Moleküle werden durch das Laserlicht angeregt und senden Photonen entsprechend ihres Emissionsspektrums aus. Die Fluoreszenzemission wird durch dasselbe Objektiv gesammelt und konfokal über eine Lochblende (engl. „pinhole“) mittels eines hochempfindlichen Einzelphotonendetektors erfasst (vgl. Material und Methoden 2.4.1.). Im Rahmen der klassischen Anwendung der FCS-Methode werden Fluktuationen von fluoreszenzmarkierten Partikeln im stationären Fokusmessvolumen auf Grund der Brownschen Molekularbewegung genutzt, um Parameter wie die Partikelzahl, die Partikelhelligkeit und den Diffusionskoeffizienten der Partikel zu analysieren. Bei einer Konzentration von 1 nM befindet sich dabei in dem ca. 1 fl großen Fokusmessvolumen im zeitlichen Mittel etwa ein Teilchen. Je kleiner also die Konzentration der Partikel in der zu untersuchenden Lösung ist, umso größer ist durch den Ein- und Austritt der Partikel im Lasermessfokus die relative Signalfluktuations. Die Weiterentwicklung dieser Technik zur zweifarbigen FCS mit zwei verschiedenen Laseranregungswellenlängen [38,172] ermöglicht es, äußerst effizient Aggregations- bzw. Enzymkinetiken zu verfolgen und die FCS als Screeningmethode für homogene Assays einzusetzen [4,98,199]. Gerade in der Untersuchung nano- bis subpicomolarer Konzentrationen liegt dabei die Stärke der FCS hinsichtlich der Charakterisierung kleiner monomerer Proteine bzw. verschiedener Proteinaggregate oder Polynukleotide [171]. Der Messbereich wird dabei durch die Konzentration der messbaren Partikel in der Messlösung limitiert. Allerdings ist für die FCS-Auswertung die Größe der Partikel entscheidend, welche die Analyse limitieren kann. Da die Partikelgröße mit einer steigenden Diffusionszeit korreliert, nehmen auch die diffusionbedingten Durchtritte durch einen stationären Lasermessfokus in ihrer Häufigkeit ab. Dies hat zur Folge, dass große Partikel innerhalb der Messzeit ggf. nicht mehr hinreichend für die Analyse erfasst werden.

In Ergänzung zur klassischen FCS, welche die Fluoreszenzfluktuation über die Zeit verfolgt, gibt es eine weitere Analyseemethode, welche unabhängig von der Diffusionszeit innerhalb des stationären Fokus ist. Im konfokalen Messaufbau wird dabei die Helligkeitsfluktuation in konsekutiven Zeitsegmenten (engl. „bins“) mittels der Fluoreszenz-Intensitäts-Verteilungs-

Analyse (engl. „fluorescence intensity distribution analysis“, FIDA) verfolgt und ausgewertet. Dieses Verfahren eignet sich besonders, um verschiedene, in unterschiedlicher Intensität fluoreszierende Molekül- bzw. Aggregatspezies bezüglich ihrer Konzentration und spezifischen Helligkeit nachzuweisen. [88,89]. Die FIDA bietet außerdem den Vorteil, dass sie für die Erfassung und Analyse großer, seltener Partikel in Messungen mit einem mobilen Fokus (engl. „beamscanner“) verwendet werden kann. Dabei verharrt der Laserfokus nicht stationär, sondern bewegt sich mit einer Geschwindigkeit von typischerweise 1-10 mm/sec durch die Messprobe. Durch das Scannen der Probe wird das in der Messung erfasste Volumen und somit die Zahl der Partikel, die den Laserfokus passieren, deutlich vergrößert. Der Vorteil gescannter Messungen liegt darin, dass somit auch helle, seltene, langsam diffundierende Partikel effizient erfasst und analysiert werden können. Ein weiteres Auswerteverfahren der gescannten Messungen bietet die SIFT-Technik (engl. „scanning for intensely fluorescent targets“, Scannen nach hochintens fluoreszierenden Zielstrukturen). Mit dieser zeitaufgelösten Intensitätsanalyse des Fluoreszenzsignals in aufeinander folgenden Zeitintervallen (Bins) und der analytischen Abtrennung hochintensiver Signale vom Hintergrundsignal kann selektiv das Vorhandensein großer Aggregate effizient untersucht werden. Ein möglicher praktischer Einsatz der SIFT-Methode bietet sich u.a. in der ultrasensitiven Detektion pathologischer Prionproteinaggregate im Liquor von Creutzfeldt-Jakob-Patienten [53].

Da es klare Hinweise dafür gibt, dass Aggregationsprozesse des α -Synucleins eine entscheidende Rolle in der Pathogenese des Morbus Parkinson spielen, dies aber in der gängigen Literatur nur sehr spärlich auf Einzelmolekülebene bzw. im subpicomolaren Konzentrationsbereich bearbeitet worden ist, bietet sich auf diesem Gebiet die konfokale Einzelmolekülspektroskopie mit FCS, FIDA und SIFT zur Untersuchung dieser Aggregationsprozesse an. Von entscheidendem Vorteil sind, neben einem geringen Materialverbrauch und kleinen Probenvolumina, die gute Detektierbarkeit der Proteinmonomere und diverser Aggregatspezies, sowie die hohe Zahl an erfassbaren Analyseparametern innerhalb der gleichen Messung. Für meine Promotionsarbeit waren daher die FCS-, die FIDA- und die SIFT-Analysen die zentralen Untersuchungsmethoden. Die theoretischen Grundlagen, sowie die technische Realisierung sind detailliert im Material- und Methodenteil erläutert (vgl. Material und Methoden 2.4.)

1.6. Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Bildung und Eigenschaften von α -Synuclein-Aggregaten, die eine zentrale Rolle in der Pathogenese des Morbus Parkinson und anderer Synucleinopathien spielen, unter verschiedenen Bedingungen auf molekularer Ebene zu charakterisieren. Besonderes Gewicht lag dabei zunächst auf der Entwicklung und der Etablierung eines experimentellen Ansatzes, der eine Analyse mittels konfokaler Einzelmolekülspektroskopie ermöglichte. Mit diesem Ansatz sollten dabei zunächst grundlagenwissenschaftliche Fragestellungen wie z.B. die Rolle von Metallionen und die Interaktion von Aggregaten mit Lipidmembranen untersucht werden, um dann diese Ergebnisse für die Entwicklung neuer pharmakologischer Therapieansätze einzusetzen. Konkret sollten hierzu folgende Fragestellungen untersucht werden:

Zunächst sollte rekombinantes, humanes α -Synuclein mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt und hinsichtlich seines Aggregationsverhaltens in verschiedenen Pufferbedingungen auf Einzelmolekülebene charakterisiert werden.

Ein analytischer Schwerpunkt sollte hierbei die Charakterisierung oligomerer Aggregationsintermediate auf Einzelpartikelebene sein.

Der bekannte, strukturbeeinflussende Effekt organischer Lösungsmittel sollte hinsichtlich der *de novo* Aggregation und der Entstehung unterschiedlicher Aggregatspezies auf Einzelmolekülebene erforscht werden. Hierauf aufbauend sollte eine funktionelle Interaktion verschiedener Metallionen, insbesondere des Eisens, mit den induzierten Aggregaten untersucht werden.

Die potentiell toxischen Aggregatspezies sollten bezüglich ihres Bindungsverhalten und ihrer Wechselwirkung mit Lipidmembranen verschiedener Zusammensetzung charakterisiert werden. Zusätzlich sollten hierbei elektrophysiologische Untersuchungen zur Bildung von Membranporen durch oligomere Aggregate in Kollaboration mit der Firma Ionovation durchgeführt werden.

Schließlich sollten die gewonnenen Erkenntnisse nach Identifizierung einer oligomeren Zielstruktur zur Entwicklung eines pharmakologischen Screeningansatzes verwendet werden.

In einem Pilotscreen sollte dann eine Anzahl chemisch unterschiedlicher Verbindungen hinsichtlich einer Wirkung als Aggregationsinhibitoren mit dem Ziel getestet werden, der Entwicklung neuer kausaler pharmakologischer Therapieansätze gegen neurodegenerative Erkrankungen, insbesondere gegen Morbus Parkinson, zu dienen.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

Allgemeine Verbrauchsmaterialien (Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen) wurden von den Firmen Eppendorf (Hamburg), Roth (Karlsruhe), Sarstedt (Nümbrecht) und VWR (Ismaning) bezogen. Die einmalig verwendeten Materialien wurden vor der Verwendung autoklaviert. Die Bezugsquellen der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Proteine sind im Folgenden aufgeführt. Alle Chemikalien besaßen die höchste kommerziell erhältliche Reinheit. Das Wasser für die verwendeten Lösungen wurde mit einem Milli-Q Synthesis A10 System (Millipore, MA, USA) aufbereitet.

Chemikalien	Firma
Acrylamid	Merck (Darmstadt, Deutschland)
APS (Ammoniumpersulfat)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
AlCl ₃ -Hexahydrat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-phosphat)	Roche (Mannheim, Deutschland)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt, Deutschland)
BSA (Bovines Serumalbumin)	Sigma (München, Deutschland)
CaCl ₂ -Dihydrat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
CuCl ₂ -Dihydrat	Sigma (München, Deutschland)
Desferroxamin-Mesylat	Sigma (München, Deutschland)
DMF (Dimethylformid)	VWR (Ismaning, Deutschland)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma (München, Deutschland)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ethanol pro analysi	Merck (Darmstadt, Deutschland)
FeCl ₃ -Hexahydrat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Glycin	Sigma (München, Deutschland)
HCl (Salzsäure rauchend)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
H ₂ O ₂ (30%)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Isopropanol	Merck (Darmstadt, Deutschland)
KCl pro analysi	Merck (Darmstadt, Deutschland)
LiChrosolv	Merck (Darmstadt, Deutschland)
MgCl ₂ -Hexahydrat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
β-Mercaptoethanol	Sigma (München, Deutschland)
Methanol	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Milchpulver Blotting Grade	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
MnCl ₂ -Tetrahydrat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumascorbat (Vitamin C)	Sigma (München, Deutschland)
NaCl pro analysi	Merck (Darmstadt, Deutschland)
NaHCO ₃ reinst	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Na ₂ HPO ₄ -Dihydrat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
NaH ₂ PO ₄ -Monohydrat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
NaOH (Natronlauge)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Nitroblau Tetrazoliumchlorid (NBT)	Roche (Mannheim, Deutschland)
NP-40 (Igepal-CA-630)	Sigma (München, Deutschland)
PBS-Tablets (10mM Phosphatpuffer, pH 7,4; 140 mM NaCl; 2,7 mM KCl)	Calbiochem (Schwalbach, Deutschland)

Pluronic	Sigma (München, Deutschland)
Sephadex G25	Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden)
Saccharose	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
TEMED (N,N, N', N'-Tetramethylethyldiamin)	Sigma (München, Deutschland)
TRIS-(2-Carboxyethyl)-Phosphine-Hydrochlorid	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Triton-X-100	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Tween-20	Roth (Karlsruhe, Deutschland)

Materialien	Firma
Amicon Ultra-4 (5000 MWCO)	Millipore (Schwalbach, Deutschland)
Bioplate – 96	Evotec Technologies (Hamburg, Deutschland)
Bioplate – 384	Evotec Technologies (Hamburg, Deutschland)
GB 004 Gel-Blotting-Papier	VWR (Ismaning, Deutschland)
Hyperfilm ECL	Amersham Pharmacia (Piscataway, USA)
PCR-Strips	Kisker (Steinfurt, Deutschland)
PD 10 Säulen	Amersham Pharmacia (Piscataway, USA)
PVDF (Polyvinylidenfluorid) Membran	Millipore (Schwalbach, Deutschland)
Quarzküvetten	Perkin Elmer (Wellesley, USA)
Quarzspaltküvetten	Hellma Optik (Jena, Deutschland)
Adhäsive Klebefolie	Kisker (Steinfurt, Deutschland)
Fluoreszenzfarbstoffe	Firma
Alexa Fluor 488 Carboxylic Acid Succinimidyl Ester	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Alexa Fluor 647 Carboxylic Acid Succinimidyl Ester	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
β-BODIPY FL C12-HPC	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
ThT (Thioflavin T)	Sigma (München, Deutschland)
Biologische Materialien	Firma
Anti-Oligomer Antikörper (A11)	AG Kostka (Boehringer-Ingelheim, Biberach, Deutschland)
Anti-α-Synuclein Antikörper (Asy1)	PHJ, Universität Aarhus, Dänemark
Anti-Aβ-Antikörper (6E10)	AG Kostka (Boehringer-Ingelheim, Biberach, Deutschland)
Anti-α-Synuclein Antikörper (15G7)	ZNP, LMU München, Deutschland
Anti-Ratte IgG (H+L) AP-gekoppelt	Zymed Technologies (San Francisco, CA, USA)
POPC (1-Palmityl-2-Oleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholin)	Avanti Polar Lipids (Alabaster, Al, USA)
DPPC (Dipalmitoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholin)	Avanti Polar Lipids (Alabaster, Al, USA)
Molekulargewichtsstandard: peqGOLD Protein-Marker IV (Prestained)	PeqLab (Erlangen, Deutschland)
Proteinase K	Merck (Darmstadt, Deutschland)

Antiaggregative Substanzen	Firma
Baicalein	Sigma (München, Deutschland)
Rifampicin	AG Kostka (Boehringer-Ingelheim, Biberach, Deutschland)
Curcumin	AG Kostka (Boehringer-Ingelheim, Biberach, Deutschland)
(-)-2-Amino-6-n-Propylamino-4,4,5,6,7-Tetrahydrobenzo-Thiazol	AG Kostka (Boehringer-Ingelheim, Biberach, Deutschland)
(+)-2-Amino-6-n-Propylamino-4,4,5,6,7-Tetrahydrobenzo-Thiazol	AG Kostka (Boehringer-Ingelheim, Biberach, Deutschland)
N'-Benzyliden-Benzohydrazid-Derivate	ChemBridge Corp. (San Diego, CA, USA)

Puffer für die α -Synuclein-Markierungsreaktion

NaHCO ₃	1 M Natriumhydrogencarbonat pH 8,5
NaPi	50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0
Tris-HCl	50mM Tris-HCl pH 7,0

Puffer und Lösungen für die FCS-, CD-, ThT-Messungen und die WB-Analyse

AP- Puffer (CLZ-Puffer)	5 mM MgCl ₂ , 100 mM NaCl, 100 mM Tris, pH 9,5
Blocking-Puffer	5 % (W/V) Magermilchpulver, PBS-Tween 0,1% (V/V) pH 7,4
Blotting-Puffer	0,025 M Tris, 0,192 M Glycin, 0,1 % (V/V) SDS, 20 % (V/V) Methanol
Laemmli (Proben)-Puffer (5fach)	50 mM Tris-HCl pH 6,8, 15 % (W/V) SDS, 40 % (W/V) Saccharose, 20 % (V/V) β -Mercaptoethanol, 0,2 % (W/V) Bromphenolblau, 1 mM EDTA
Laufpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (V/V) SDS,
NaPi	50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0
NaPi-NP-40	50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0 mit 0,1 % bzw. 0,01 % (V/V) NP-40
PBS-Tween	PBS pH 7,4 mit 0,1 % (V/V) Tween
SDS-Stammlösung	2 % (W/V) in Milliporewasser
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl pH 6,8
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl pH 8,8
Tris-HCl	50 mM Tris-HCl pH 7,0
Tris-HCl-NP-40	50 mM Tris-HCl pH 7,0 mit 0,1 % bzw. 0,01 % (V/V) NP-40
Tris-HCl (ThT)	20 mM Tris-HCl pH 7,4; 0,1 M NaCl

Das zur Arbeit verwendete rekombinante α -Synuclein wurde für die initialen Versuche freundlicherweise von der AG Marcus Kostka (CNS Research, Boehringer-Ingelheim, Biberach, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Im Verlauf der Arbeit wurde die Expression und Reinigung am Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung (LMU München) in Zusammenarbeit mit Dr. Matthias Habeck und Felix Schmidt etabliert und durchgeführt.

α-Synuclein	
Humanes wt- α -Synuclein (MW 14460 kDa)	AG Kostka (Boehringer-Ingelheim, Biberach, Deutschland)
Humanes wt- α -Synuclein (MW 14460 kDa)	ZNP, LMU München, Deutschland

2.2. Proteinexpression

Analog zu Nuscher *et al.* [141] wurde das pET-5a/Synuclein wt-Plasmid (Prof. Phillip Kahle, LMU München, jetzt Universität Tübingen) für die Transformation von E.coli BL21(DE3) pLysS (Novagen, Madison, WI, USA) verwendet. Die Expression in der Bakterienkultur wurde für 4 Stunden mit Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranose (IPTG, Promega, Mannheim, Deutschland) induziert. Anschließend wurden die Zellen durch Gefrieren in flüssigem Stickstoff, durch Auftauen und Sonifikation lysiert. Nach 30 minütigem Kochen wurde das Lysat bei 17600 x g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand durch einen 0,22 μ m Filter (Millex-GV, Millipore Corp., Bedford, MA, USA) gefiltert, anschließend auf eine Q-Sepharose Säule (HiTrap Q HP, 5 ml, Amersham Biosciences, München, Deutschland) aufgetragen und über einen 25 mM-500 mM Salzgradienten eluiert. Die vereinigten α -Synucleinmonomerfraktionen wurden anschließend durch eine Superdex 200 HR10/30 Gelfiltration (Amersham Biosciences, München, Deutschland) mit 20 mM Tris-HCl 25 mM NaCl (pH 8,0) als Laufpuffer von Salzurückständen befreit. Im Folgenden wurden die α -Synucleinfraktionen mit Vivaspin Säulen MWCO 5kDa (Vivasciene, Stonehouse, UK) aufkonzentriert und mit Wasser äquibriert. Die Proteinkonzentration wurde mit einem BCA Protein Quantifikationskit (Pierce, Rockford, IL, USA) bestimmt und die Proben anschließend aliquotiert, lyophilisiert und bei -80°C aufbewahrt.

2.3. Fluoreszenzmarkierung von α -Synuclein

Um die Aggregation von α -Synuclein mittels konfokaler Einzelmolekülspektroskopie zu untersuchen, wurde rekombinantes α -Synuclein mit den Fluoreszenzfarbstoffen Alexa Fluor-488-O-Succinimidylester bzw. Alexa Fluor-647-O-Succinimidylester markiert. Prinzipiell wird dabei die Reaktion der als Succinimidylester vorliegenden Farbstoffe mit den im entsprechenden Protein vorkommenden primären Aminogruppen für die kovalente Verknüpfung genutzt, um somit stabile Farbstoff-Protein-Konjugate zu formen. Mit dem Ziel, jedes α -Synucleinmonomer im Mittel ein- bis zweifach zu markieren, setzte ich im Reaktionsansatz den jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff im stöchiometrischen Verhältnis von zwei zu eins im Vergleich zur molaren Konzentration des α -Synucleins ein (Endkonzentration

des α -Synucleins im Markierungsansatz 63 μ M). Um ein geeignetes Reaktionsmilieu zwischen pH 7,5 und 8,5 für die Bindung der Succinimidylester zu schaffen, beinhaltete der Ansatz 10 vol% einer 1 M NaHCO_3 -Lösung (pH 8,5). Nach 12 Stunden Inkubation bei 4 °C wurden die ungebundenen Farbstoffmoleküle des Reaktionsansatzes chromatographisch abgetrennt. Dies erfolgte in zwei Filtrationsschritten mittels PD10 Säulen, welche mit 50 mM NaPi Puffer pH 7,0 oder 50 mM Tris-HCl pH 7,0 zuvor äquilibriert worden waren. Darauffolgend schlossen sich sechs Zentrifugierungsschritte (Eppendorf Centrifuge 5810, R-Swing angle A462) in Amicon-Ultra-4 Röhrchen (5000 kDa MW) an, wodurch sich nicht nur verbliebene freie Farbstoffmoleküle abtrennen ließen, sondern die α -Synucleinlösung auch umgepuffert und aufkonzentriert werden konnte. Der Markierungsreaktion schloss sich eine ausführliche Qualitätskontrolle der Farbstoff-Protein-Konjugate an. Mittels FCS wurde das markierte α -Synuclein hinsichtlich der Markierungsrate, der Diffusionszeit und der Partikelzahl evaluiert sowie die Partikelzahl des freien Farbstoffes in einem Zwei-Komponenten-Fit bestimmt (Ergebnisse 3.1.). Um die Stammlösung von potentiell präformierten Aggregaten zu befreien, wurde die markierte α -Synucleinlösung in Zusammenarbeit mit der AG Dr. Marcus Kostka in einer Größenausschlusschromatographie über eine Superdex 200 Gelfiltrationssäule (Amersham Biosciences, München, Deutschland) eluiert und das Eluat photometrisch bei 215-280 nm verfolgt. Die Monomerfraktionen wurden anschließend vereinigt. Am ZNP der LMU München wurde die Stammlösung einer Ultrazentrifugation (Optima MAX-XP, Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) bei 45000 g für 30 min unterzogen und mittels SIFT-Messung (vgl. Material und Methoden 2.4.3.4.) auf die Anwesenheit von präformierten Aggregaten erneut untersucht. Die Stammlösungen wurden im Anschluss an die Qualitätskontrollen aliquotiert und bei -80 °C vor Licht geschützt bis zu ihrer Verwendung gelagert.

2.4. Konfokale Einzelmolekülspektroskopie

Um auf Einzelmolekülebene das Aggregationsverhalten des α -Synucleins zu studieren und die Charakterisierung verschiedener Aggregatspezies durchzuführen, wurde in dieser Arbeit die konfokale Einzelmolekülspektroskopie eingesetzt, im Besonderen die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (engl. „fluorescence correlation spectroscopy“, FCS) mit der Autokorrelations- und Kreuzkorrelationsanalyse, die Fluoreszenz-Intensitäts-Verteilungsanalyse (engl. „fluorescence intensity distribution analysis“, FIDA) und das Scannen nach intensiv fluoreszierenden Zielstrukturen (engl. „scanning for intensely

fluorescent targets“, SIFT). Das theoretische Konzept der FCS-, FIDA- und SIFT-Methode wurde ausführlich von Schwille [6,171,172], Kask [88,89] und Bieschke/Giese [15,53] beschrieben. Im Folgenden sollen kurz das Prinzip der Messmethode und die verschiedenen Analyseverfahren beschrieben werden.

2.4.1. Messaufbau

Das Aggregationsverhalten von fluoreszenzmarkiertem, rekombinantem α -Synuclein wurde in dieser Arbeit mittels konfokaler Einzelmolekülspektroskopie untersucht [53,54,171,172]. Die Messungen wurden mit einem Insight Reader durchgeführt (Evotec-Technologies, Hamburg, Deutschland). Im Grundaufbau stellt dieses Gerät ein konfokales Mikroskop dar. Durch den Messaufbau wird Laserlicht eines Argon-Ionen-Lasers und eines Helium-Neon-Lasers mit den Wellenlängen 488 nm bzw. 633 nm durch ein 40x Wasserimmersionsobjektiv (Olympus, Japan) mit hoher numerischer Apertur (1,2) in das Probevolumen fokussiert. Das Fokusbildungsvolumen beträgt dabei ca. einen Femtoliter. Als Probenträger fungieren mit einem Metallrahmen und Glasboden versehene 96-Multiproben-Platten (96well Platten, Evotec-Technologies/Perkin Elmer, Hamburg, Deutschland), die ein Reaktionsvolumen von 30 μ l/Well bieten. Der Laserfokus wird 150 μ m über dem Glasboden des Probenträgers in die Messlösung eingestellt. Optisch wird die Position des Laserfokus mit einer über Spiegel mechanisch zuschaltbaren Videokamera kontrolliert. Das offene Messvolumen der konfokalen Einzelmolekülspektroskopie wird aus den beiden sich überlagernden Laserfoci gebildet. Der Radius des roten (633 nm) Fokus ist physikalisch bedingt etwas größer als der des grünen. Trotz einer minimalen Abweichung der Mittelpunkte beider Laserfoci von ca. 50 nm, bildet die optische Apparatur aber den grünen Laserfokus vollständig innerhalb des roten Fokus ab. Die nach Anregung der fluoreszierenden Partikel im Lasermessfokus emittierten Photonen werden retrograd dem Weg des Anregungslichts entgegen durch die Objektivlinse über zwei dichroische Spiegel und eine Lochblende (engl. „pinhole“, Durchmesser 70 μ m) getrennt auf zwei Einzelphotonendetektoren (Avalanche-Photodioden, APD) geleitet (Abb. 2.1.). Dadurch ist es möglich, das Fluoreszenzsignal in zwei Kanälen separat voneinander aber trotzdem parallel zueinander aufzuzeichnen und auszuwerten. Die APDs liegen bis 100 kHz Gesamthelligkeit (I_{tot}) in einem Bereich, in dem sie lineare Messergebnisse liefern. Um nicht in die Totzeit der Detektoren (>3000 kHz) zu gelangen und um eine gute Auswertbarkeit der Messungen zu gewährleisten, sollte dieser Bereich der Gesamthelligkeit nicht überschritten werden. Über die Software *FCS+Plus_Control* können die hochpräzisen

Motorsteuerungssysteme und Mikroschrittmotoren für den Proben­träger­ Tisch, die Positionen der Laserfoci und der Lochblende am Insight Reader gesteuert werden.

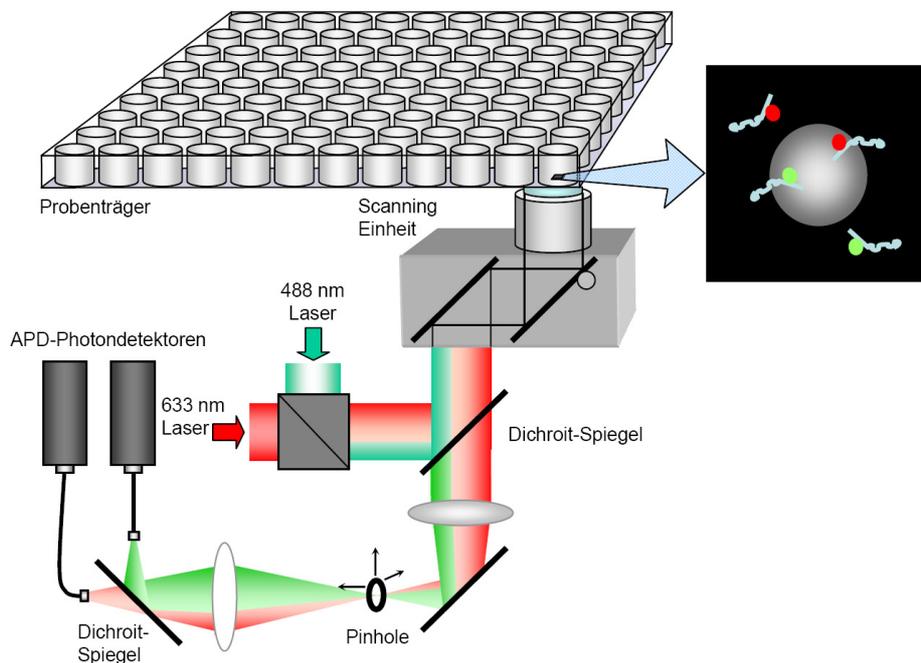


Abb. 2.1. Messaufbau des Insight Readers.

Schematische Darstellung des zwei-Farben-FCS-Readers mit Beamscanner-Einheit. Das Laserlicht wird über einen Dichroit-Spiegel und die konfokale Optik des Mikroskops in das Proben­volumen fokussiert. Das emittierte Fluoreszenzlicht kommt über denselben Weg zurück, passiert jedoch den Dichroit und wird über eine Lochblende (Pinhole) auf die Photodetektoren (Avalanche-Photodioden) abgebildet.

2.4.2. Justage und Messbedingungen

Die Justage und Inbetriebnahme wurden immer nach einem festen Schema durchgeführt. Um eine konstante und gleichmäßige Laserleistung während der Experimente sicherzustellen, wurden die Lasermodule mindestens 30 Minuten vor Beginn der ersten Messung in Betrieb genommen. Im Anschluss an die Aufwärmphase wurde die Laserleistung sowohl für den Argon-Laser bei 488 nm, als auch für den Helium-Neon-Laser bei 633 nm mittels eines in den Strahlengang eingeschobenen Detektors separat gemessen und auf die Anregungsleistungen von 200 μW (488 nm Laser) bzw. 300 μW (633 nm Laser) eingestellt. Danach erfolgten die Justagen des Pinholes und der Glasfaserleitungen sowie die Einstellung des optischen Korrekturrings am Objektiv. Als Referenzwert für die Justage wurde eine Messlösung aus freiem Farbstoff (Alexa488 und Alexa647) mit bekannten Farbstoffmessparametern verwendet. Die entscheidenden Parameter, die zum Vergleich der Justageeinstellungen und

zur Einstellung einer optimalen Fokusabbildung herangezogen wurden, waren die CPP (engl. „counts per particle“), die ein Maß für die Helligkeit der einzelnen Farbstoffmoleküle unabhängig von der Farbstoffkonzentration darstellt, sowie die Diffusionszeit (T_{diff}) der Farbstoffmoleküle, mit der sich die Abbildungsschärfe des Lasermessfokusses bestimmen lässt. Nach Einstellung der entsprechenden Parameter wurde für jeden Messtag eine Justagemessung durchgeführt und die Justagewerte und Einstellungen am Insight Reader nach jeder Eichung zu Kontrollzwecken notiert.

Die Messzeit der zu untersuchenden Proben betrug in der Regel 10-15 sec pro Einzelmessung (20 μl Reaktionsansatz). Während der gescannten Messungen wurde die Länge des „Scan-Pfades“ auf 100 μm , die Frequenz des mobilen Fokus (Beams scanner) auf 50 Hz und die Distanz der Probentischverschiebung auf 2000 μm festgesetzt. Daraus resultierte eine Geschwindigkeit mit der sich der Messfokus durch die Probe bewegt von $v_{\text{scan}} = 2 * 100 \mu\text{m} * 50 \text{ Hz} = 10 \text{ mm/sec}$. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt.

2.4.3. Analyseverfahren der konfokalen Einzelmolekülspektroskopie

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, kommt es bei der konfokalen Einzelmolekülspektroskopie durch den Ein- und Austritt fluoreszenzmarkierter Partikel in ein offenes Detektionsvolumenelement definiert durch einen Lasermessfokus und einer damit verbundenen Anregung durch das Laserlicht im stationären oder mobilen Messfokus zu einer Fluoreszenzsignalfuktuation. Das gemessene Fluoreszenzsignal kann durch verschiedene Analyseverfahren ausgewertet werden:

2.4.3.1. Autokorrelationsanalyse

Bei der Autokorrelationsanalyse, die nur bei Messungen mit einem stationären Fokus sinnvoll anzuwenden ist, wird die Signalfuktuation über die Zeit durch die Korrelationsfunktion $G(\tau)$ charakterisiert. Mathematisch betrachtet, gibt diese Funktion die Selbstähnlichkeit eines Signals zum Zeitpunkt t mit dem Zeitpunkt $t+\tau$ an [43,171]. Bei der für die Autokorrelationsanalyse in meiner Arbeit verwendeten *FCSP Evaluation Software Version 2.0* (Evotec Technologies, Hamburg, Deutschland) wird dabei die Messzeit der Einzelmessung in Zeitfenster von minimal 50 ns unterteilt. Je nachdem, ob in diesen Zeiteinheiten Photonen detektiert worden sind oder nicht, wird der Zeitscheibe der Zahlenwert 1 oder 0 zugeordnet. Daraus resultiert eine Zahlenreihe von aufeinanderfolgenden Einsen und Nullen, welche die in Zeiteinheiten von 50 ns aufgesplitterte Messung mit der Kodierung: „1 = mindestens 1 Photon detektiert oder 0 = kein Photon detektiert“ beschreibt.

Anschließend wird für die Autokorrelationsanalyse der Wert jeder Zeit mit dem Wert einer weiteren Zeit multipliziert, die in Zeitabständen aus dem Vielfachen des kleinsten Abstandes von 50 ns entfernt liegt. Diese Zeitabstände werden als Korrelationszeiten bezeichnet. Die Multiplikation der Zeitfenster wird über den gesamten Datensatz mit verschiedenen Korrelationszeiten, die sich von 50 ns bis zu mehreren Sekunden erstrecken, durchgeführt und das Ergebnis konsekutiv für jede Korrelationszeit addiert. Zudem werden die Werte der pro Korrelationszeit detektierten Photonen auf die mittlere Häufigkeit normiert. An das beschriebene Autokorrelogramm wird eine mathematische „Fit“-Kurve in einem iterativen Prozess angepasst (engl. „fitting“). So können aus dem Autokorrelogramm verschiedene Parameter wie die durchschnittliche Diffusionszeit der Partikel (T_{diff}), die mittlere Helligkeit (CPP, engl. „counts per particle“) und die mittlere Partikelzahl im Lasermessfokus (N) berechnet werden. Der Unterschied zwischen den Autokorrelationsdaten und dem Fit wird als Residualkurve dargestellt. Um die Güte des Fits zu überprüfen, wurde der Parameter χ^2 herangezogen. Die Gesamthelligkeit (I_{tot}) entspricht dabei der mittleren Photonenzahl (angegeben in kHz) über die gesamte Messzeit der Einzelprobe und geht direkt als gemessene Größe direkt aus der Messung hervor. Die mittlere Helligkeit der einzelnen Partikel im Messfokus (CPP) berechnet sich aus der Intensität des gemessenen Fluoreszenzsignals pro Anzahl der Partikel. Im Rahmen der Justage ist die CPP eine wichtige Größe, da die CPP der Farbstoffmoleküle unabhängig von der Farbstoffkonzentration ist. Somit lässt sich die Güte der Justage zwischen den verschiedenen Messtagen vergleichen. Ein weiterer Parameter, der die Eigenschaft verschiedener Partikel beschreibt, ist die Diffusionszeit (T_{diff}). Mit Hilfe der Diffusionszeit ist es möglich, die ungefähre Masse der gemessenen Partikel zu berechnen. Für kugelförmige Partikel gleicher Dichte, wie Proteinmoleküle näherungsweise angesehen werden können, besteht dabei die Möglichkeit, mit der Formel $T_{\text{diff}} \sim \sqrt[3]{MW}$ aus der Autokorrelationsfunktion die Größe bzw. das Molekulargewicht (MW) anzunähern. Somit entspricht beispielsweise eine Verdoppelung der Diffusionszeit im Vergleich zweier Partikelspezies einer achtfach größeren Masse. Im Rahmen von Proteinaggregationsstudien kann somit die Anzahl der Monomere, aus denen sich ein Proteinaggregat zusammensetzt, näherungsweise bestimmt werden. Während einerseits im Verlauf von Aggregationsprozessen die Diffusionszeit und die CPP der Partikel zunehmen, sinkt andererseits die Partikel- bzw. Teilchenzahl (N), womit ein weiterer entscheidender Parameter der FCS-Auswertung genannt ist. Nach Einführung einer Normalisierungskonstanten entspricht die Partikelzahl (N) der inversen Amplitude der Autokorrelationsfunktion (Abb. 2.2.).

Das Software Modul *FCSPP Evaluation* erlaubt auch, das gewonnene Fluoreszenzsignal aus der Messlösung nicht nur mit einer Partikelspezies zu beschreiben bzw. zu fitten, sondern auch verschiedene in der Messprobe vorkommende Molekülspezies zu erkennen und zu berechnen. In einem sog. Mehrkomponenten-Fit liefert die Software für jede Komponente den relativen Anteil an der Gesamtmenge der Partikel (in %) und eine entsprechende eigene Diffusionszeit [6,37,43,69,129,171].

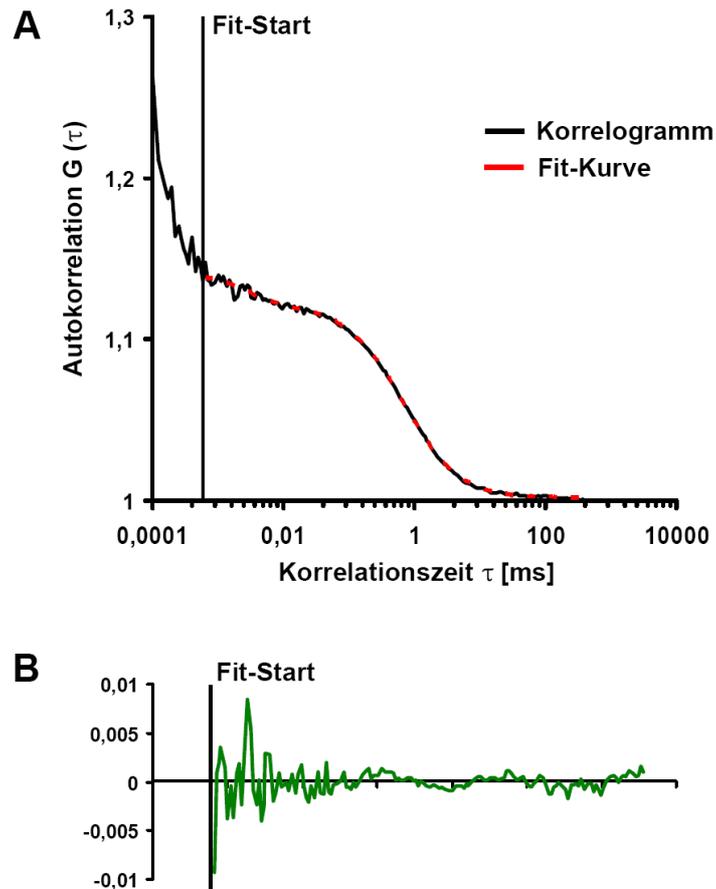


Abb. 2.2. Autokorrelogramm

A) Typisches Autokorrelogramm einer FCS-Messung. Die Y-Achse zeigt die Autokorrelationswerte und die X-Achse die Korrelationszeiten. Mit der roten Kurve ist der Fit dargestellt. B) Qualitätskontrolle des Fits durch die Residualkurve, welche die Abweichung des Autokorrelogramms vom Fit darstellt.

2.4.3.2. Kreuzkorrelationsanalyse

Dieses Analyseverfahren stellt eine Weiterentwicklung der Autokorrelationsanalyse dar und erfordert einen konfokalen Messaufbau mit zwei unterschiedlichen Einzelphotonendetektoren (APDs). Die Kreuzkorrelationsanalyse (XCorr) stellt dabei eine äußerst sensitive Methode dar, um intermolekulare Bindungsprozesse hinsichtlich der Bildung und der Auflösung von Aggregaten quantitativ zu analysieren. Anders als bei der Autokorrelationsanalyse kommt es dabei nicht zum Selbstvergleich der Signalintensität innerhalb eines Kanals, sondern es wird die detektierte Signalintensität $I_1(t)$ des einen Detektors (z.B. grün) mit der Signalintensität $I_2(t+\tau)$ des zweiten Detektors (z.B. rot) verglichen und korreliert, wobei τ wiederum die Korrelationszeit darstellt. Die XCorr wird typischerweise in biologischen Systemen angewandt, die unterschiedlich fluoreszenzmarkierte Bindungspartner beinhalten [6,43,172]. Diese „zweifarbige“ Analysemethode ermöglicht es dabei, durch die Detektion molekularer Koinzidenzen Partikelspezies, die sowohl grüne als auch rote Fluorophore tragen, sehr gut vom übrigen Signal abzutrennen. Unter der Annahme, dass während der Messung die Gesamthelligkeit unverändert bleibt, ist dabei die Kreuzkorrelationsamplitude direkt proportional zur Konzentration verschiedenfarbig markierter Partikel, die durch den stationären Lasermessfokus diffundieren. Mit Hilfe der Kreuzkorrelationsfunktion $G(\tau)$ lassen sich somit Parameter wie die Konzentration, die Diffusionszeit und die spezifische Helligkeit der zweifarbig markierten Partikelspezies im Reaktionsansatz bestimmen [6,43] (Abb. 2.3.).

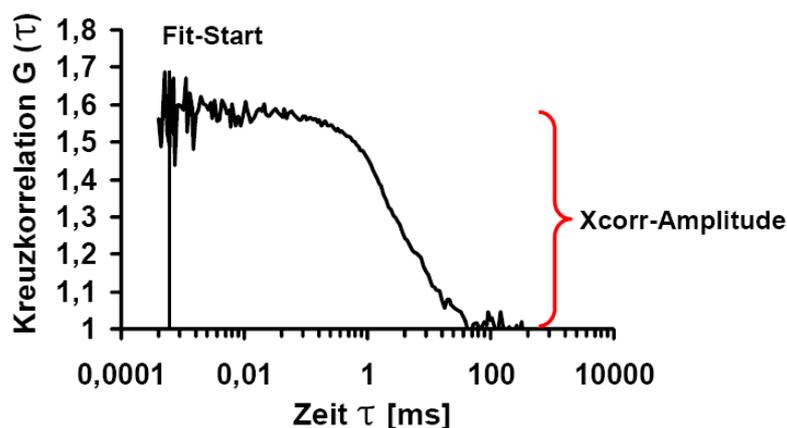


Abb. 2.3. Kreuzkorrelation

Darstellung einer typischen Kreuzkorrelationskurve. Die Y-Achse gibt die Kreuzkorrelation $G(\tau)$ an. Die X-Achse stellt die Zeit in Millisekunden dar.

Die Kreuzkorrelationsamplitude $G(0)$, die mit der Anzahl zweifarbiger Aggregate korreliert, kann auch in gescannten Messungen unabhängig von der Diffusionszeit als Maß für die intermolekularen Koinzidenzen berechnet werden. Dadurch bietet die XCorr mit ihrer sehr hohen Detektionsspezifität auch in gescannten Messungen eine Analysemethode, um Aggregationsprozesse zu verfolgen [52,54,115].

2.4.3.3. FIDA

Die FIDA-Analyse ist eine äußerst vielseitig einsetzbare Technik, die besonders geeignet ist, verschiedene Molekülspezies hinsichtlich ihrer spezifischen Helligkeit zu charakterisieren und zu unterscheiden [43,88,89]. Im Gegensatz zur FCS wird bei der FIDA im konfokalen Messaufbau die Helligkeitsverteilung in konsekutiven Zeitintervallen statistisch ausgewertet. Analog zu der FCS wurde dafür die *FCSP Evaluation Software Version 2.0* (Evotec Technologies, Hamburg, Deutschland) verwendet. Die Basis der FIDA-Analyse ist dabei eine statistische Analyse der Photonenzahlen, die in Zeitintervallen von konstanter Länge (engl. „bins“, typischerweise 40 μs) innerhalb der Einzelmessung detektiert werden. Die Anzahl der pro Zeitintervall detektierten Photonen und die Häufigkeit dieser Ereignisse werden dann in einem Intensitätsverteilungshistogramm dargestellt (Abb. 2.4.). Diese Daten können dann durch einen FIDA-Multikomponenten-Fit statistisch analysiert werden. Dadurch ist es möglich, die im Reaktionsansatz vorhandenen, unterschiedlich fluoreszierenden Molekülspezies auf der Basis ihrer spezifischen molekularen Helligkeit im jeweiligen Kanal zu identifizieren und zu charakterisieren. Analog zur Autokorrelationsanalyse mit den Parametern CPP und der Partikelkonzentration N wird bei der FIDA-Analyse innerhalb des Reaktionsgemisches jede Molekülspezies, die eine charakteristische, von den anderen Partikeln abweichende Fluoreszenz besitzt, mit einer für sie spezifischen Helligkeit (Q , in kHz) und einer durchschnittlichen Konzentration im Lasermessfokus (C) beschrieben. Es können gleichzeitig bis zu vier verschiedene Molekülspezies hinsichtlich ihrer durchschnittlichen Konzentration und Helligkeit statistisch ausgewertet werden. Die Güte der so ermittelten Werte wird ähnlich wie bei der Autokorrelationsanalyse durch den Parameter Chi^2 dargestellt. Dabei gilt, je kleiner Chi^2 ist, desto besser ist ein Fit, dessen Residualkurve ebenfalls zufällig um Null verteilt liegen sollte. Erfahrungsgemäß hat ein guter FIDA-Fit einen Chi^2 Wert nahe 1, was jedoch in heterogenen Lösungen mit verschiedenen Molekülspezies bis zum Wert 10 ansteigen kann. Der Qualitätsparameter Chi^2 wurde in der Analyse stets beachtet. Nachdem diese Analyse unabhängig von der Diffusionszeit ist, kann

sie sowohl für ungescannte als auch für gescannte Messungen verwendet werden. In dieser Arbeit wurde die FIDA-Analyse insbesondere bei gescannten Messungen mit dem Ziel eingesetzt, die verschiedenen, z.T. seltenen, in unterschiedlicher Intensität fluoreszierenden Molekül- bzw. Aggregatspezies bezüglich ihrer Konzentration und ihrer spezifischen Helligkeit zu analysieren.

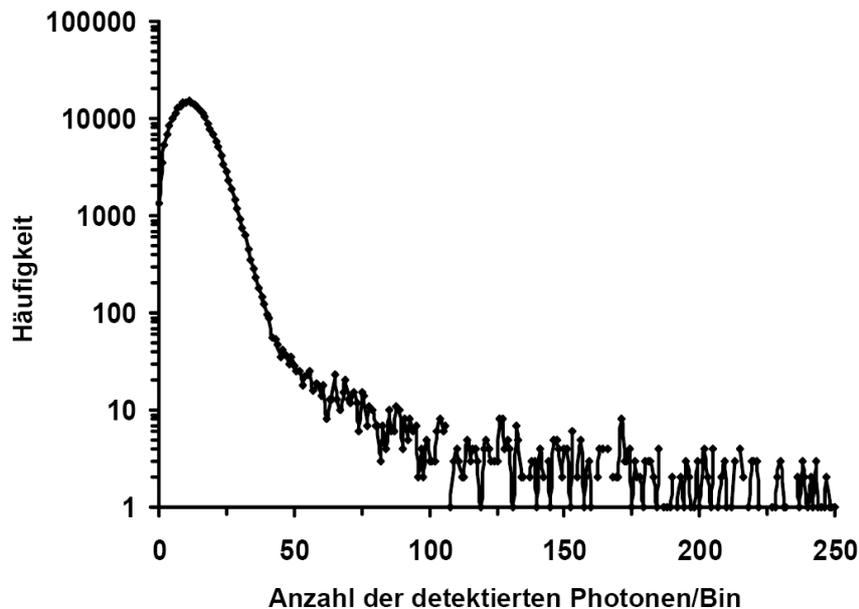


Abb. 2.4. FIDA

FIDA-Messkurve aus einer gescannten Messung. Während die X-Achse die Anzahl der detektierten Photonen pro Bin (40 μ sec) angibt, zeigt die Y-Achse die Häufigkeit der Ereignisse an. Die dargestellte Messung weist Aggregate auf, die bis zu 250 Photonen pro Bin aussenden.

Für die Analyse zweifarbig markierter Molekülspezies bietet sich zudem die 2D-FIDA-Auswertung an. Diese ist der oben beschriebenen 1D-FIDA-Analyse sehr ähnlich, stellt aber eine zwei-dimensionale Intensitätsverteilungsanalyse dar. Die Basis der 2D-FIDA-Histogramme (Abb. 2.5.) und der 2D-FIDA-Auswertung besteht aus einer statistischen Auswertung der detektierten Photonen, die in den Zeitscheiben (Bins) von typischerweise 40 μ s durch beide Detektoren simultan aufgezeichnet werden. Auf Grund dessen gehen die Signalmuster aus dem grünen und dem roten Kanal gleichzeitig in die Analyse ein. Der 2D-FIDA-Multikomponente-Fit ermöglicht es, verschiedene ein- oder zweifarbig fluoreszierende Partikel anhand ihrer spezifischen Helligkeit in beiden Detektionskanälen zu erkennen und zu analysieren. Die Gesamthelligkeit I_{tot} wird in die Anteile der verschiedenen fluoreszierenden Molekülspezies eines Reaktionsansatzes aufgeteilt, die dann wiederum jeweils anhand ihrer spezifischen Helligkeit in den beiden Detektionskanälen (grün, rot) aufgelöst werden. Neben

der spezifischen Helligkeit ein- oder zweifarbig fluoreszierender Molekülspezies kann auch deren Konzentration in einem Reaktionsgemisch analysiert werden, sofern sich die verschiedenen Spezies hinsichtlich ihrer Fluoreszenzcharakteristik messbar unterscheiden. Die Frequenz der spezifischen Kombinationen von „grünen“ und „roten“ Photonen, die gleichzeitig auf die Detektoren treffen, wird in einem zweidimensionalen Intensitätsverteilungshistogramm erfasst [43,88,89]. Um den Nachteil eines stationären Lasermessfokusses zu umgehen, der sich darin widerspiegelt, dass seltene, langsam diffundierende, große und intensiv leuchtende Partikel, wie z.B. Proteinaggregatspezies, nicht ausreichend im Messvolumen erfasst werden, kann auch in der 2D-FIDA die Beamschannereinheit aktiviert werden, was das Detektionsvolumen und die Sensitivität gegenüber seltenen, langsam diffundierenden Partikeln deutlich erhöht.

2.4.3.4. SIFT

Eine weitere Auswertung zweidimensionaler Intensitätsverteilungshistogramme erfolgte im Rahmen der hochsensitiven SIFT-Analyse [15]. Dafür wurde das *2D-SIFT Software Modul* (Evotec-Technologies, Hamburg, Deutschland) verwendet. Analog zur 2D-FIDA ist die Basis der SIFT-Analyse, dass das Fluoreszenzsignal fortlaufend in Zeitintervallen von konstanter Länge (40µsec; Bins) unterteilt und aufgezeichnet wird. Dadurch können mehrfach markierte, große Partikel, wie z.B. Aggregatspezies mit ihrem hochintensiven Fluoreszenzsignal, in der Intensitätsverteilung vom Hintergrundsignal, z.B. bedingt durch freie Monomere, analytisch über eine Schwellensetzung abgetrennt werden. Für die Messungen wird immer ein mobiler Fokus verwendet, um auch sehr langsam diffundierende Partikel zu erfassen. Mit dem Einsatz des mobilen Fokus ist es jedoch nicht mehr möglich, Parameter wie die Diffusionszeit von großen, langsam diffundierenden Partikeln zu analysieren, da die durchschnittliche Aufenthaltsdauer der Partikel im Messfokus nicht mehr durch die Beschaffenheit des Teilchens selbst, z.B. der Diffusionskonstanten (T_{Diff}), sondern von der Scangeschwindigkeit bestimmt wird. Allerdings wird durch den mobilen Fokus erreicht, dass in der SIFT-Messung das Signal hochintens leuchtender Partikel in etwa auf die gleiche Anzahl von Bins abgebildet wird. Die Anzahl dieser „hochintens Bins“, deren maximal erfassbare Photonenzahl mit dem verwendeten System bei 255 Photonen pro 40 µs liegt, korreliert somit mit der Anzahl und der Konzentration hochintens fluoreszierender Zielmoleküle (engl. „intensely fluorescent targets“). Durch die Verwendung eines Strahlenganges mit zwei Anregungslasern und Detektoren mit unterschiedlicher Wellenlänge können verschiedenfarbig fluoreszierende

Partikelspezies detektiert und analysiert werden. Die gewonnenen Daten der SIFT-Messungen werden analog zur 2D-FIDA in einem zweidimensionalen Fluoreszenzintensitätsverteilungshistogramm („Punktwolke“) visualisiert (Abb. 2.5.). Die Partikeldetektionsgrenze liegt dabei im Bereich femtomolarer, für sehr helle Partikel sogar im Bereich attomolarer Konzentrationen [15,53]. Durch das verwendete Softwaremodul werden die über einer definierten Schwelle gelegenen Bins aufsummiert. Zusätzlich zur Anzahl der hochintensen Bins kann auch die Anzahl der in diesen hochintensen Bins erfassten Photonen analysiert werden [15,52,53]. Nicht aggregierte Kontrollproben wurden als Referenz benützt, um den Schwellenwert für die Erfassung hochintensen Bins festzusetzen (Abb. 2.5.)

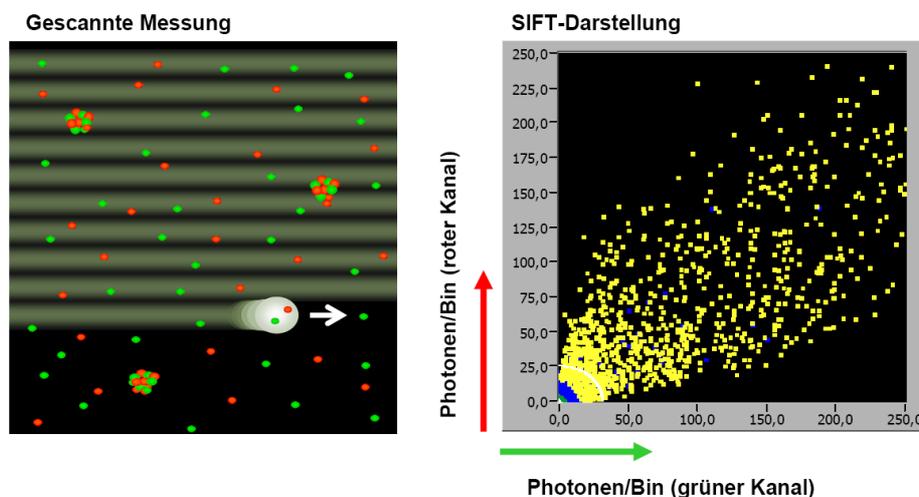


Abb. 2.5. 2D-FIDA- und SIFT-Methode

Schematische Darstellung der SIFT-Messung, bei der der Lasermessfokus durch das Probenvolumen mäandriert und somit das in der Probe erfasste Volumen im Vergleich zu einem stationären Lasermessfokus vergrößert. Im zweidimensionalen Intensitätsverteilungshistogramm wird die Anzahl der Bins mit gleichen Werten für die erfassten grünen und roten Photonen in ihrer Häufigkeit farbkodiert dargestellt.

2.5. Proteinase K Verdau

Für die Bestimmung der mittleren Anzahl an Farbstoffmolekülen pro α -Synucleinmonomer (Markierungsrate) wurde im Anschluss an die Markierungsreaktion aus jedem Ansatz eine Probe entnommen und diese mit 50 mM NaPi-NP-40 pH 7,0 oder 50 mM Tris-HCl-NP-40 pH 7,0 auf eine Konzentration von 2-5 nM α -Synuclein eingestellt. Jeder Ansatz wurde mit und ohne 0,1 mg/ml Proteinase K bei 37 °C unter ständigem Schütteln für 1 h inkubiert. Danach wurden die unverdaute Kontrolle und der verdaute Ansatz im Insight Reader analysiert. Das Verhältnis der Partikelzahl der verdauten Lösung zur Partikelzahl der unverdauten Lösung lieferte so die Anzahl der durchschnittlich pro α -Synucleinmonomer gebundenen Farbstoffmoleküle (Ergebnisse 3.1.).

2.6. Westernblot

	Sammelgel 5%	Trenngel 15%
Acrylamid-Lösung 30 %	2,4 ml	15 ml
Sammel-/Trenngelpuffer	3,75 ml	7,5 ml
SDS 10 %	150 µl	300 µl
H ₂ O	8,55 ml	7,05 ml
Temed	10 µl	105 µl
APS 10 %	150 µl	150 µl

Für eine zusätzliche Qualitätskontrolle und für den Vergleich von markiertem und unmarkiertem α -Synuclein wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)[104] durchgeführt. Dafür fand eine Gelelektrophorese-Apparatur für 10 x 10 cm² große Gele vom Typ Owl P8DS (VWR, Ismaning, Deutschland) Verwendung, wobei ein Viertel der Gellänge aus dem Sammelgel und drei Viertel aus dem Trenngel bestanden. Die Stärke der Trenngele zu Auftrennung der Probe betrug 15 % Acrylamid. Nach dem Gießen des Trenngels wurde die Trenngellösung mit Isopropanol überschichtet und für 30 min zur Polymerisierung bei RT stehengelassen. Darauf folgend wurde das Isopropanol abgegossen, die Sammelgellösung auf das Trenngel gegossen und der Kamm positioniert. Die α -Synucleinproben wurden mit 5 x Laemmli-Proteinprobenpuffer versetzt und für 10 min bei 95 °C aufgeköcht. Nach dem Abkühlen wurden die Proben und der Molekulargewichtsstandard PegGold Protein Marker IV (Merck, Darmstadt, Deutschland) auf das Gel aufgetragen. Der Einlauf der Proben durch das Sammelgel in das Trenngel wurde durch Anlegen einer Spannung von 80 V über 30 min erreicht. Für die Zeit der Auftrennung, die in der Regel ca. 90 min betrug, wurde die Spannung auf 140 V erhöht.

Für den Nachweis des α -Synucleins wurde im Anschluss an die SDS-PAGE eine Westernblotanalyse durchgeführt. Hierbei wurde die Proteinprobe durch eine Elektroelution im „semi-dry“-Verfahren [103,188] auf eine PVDF-Membran (Millipore, Eschborn, Deutschland) übertragen. Dafür wurde zunächst die Membran (9 x 7 cm) mit 100 % Methanol aktiviert und das SDS-PAGE-Trenngel zusammen mit vier an die Größe der Membran angepassten und in Blotting-Puffer aequilibrierten GB 004 Gel-Blotting-Papieren (Whatman-Papier, VWR, Ismaning, Deutschland) luftblasenfrei in eine Semiphor Transphor Blot-Apparatur (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) gelegt und abgedeckt. Für den Transfer wurde pro Gel eine Stromstärke von 50 mA bei einer Spannung von 25 mV auf die Dauer von 1 h 40 min gewählt. Nach dem Proteintransfer auf die PVDF-Membran wurden die unspezifischen Bindungsstellen durch Inkubation in 5 % Milchpulver in PBS-Tween (Blocking-Puffer) unter ständigem Schwenken für 120 min abgesättigt. Anschließend wurde

die Membran in einer Lösung des in PBS-Tween 1:2000 verdünnten Anti- α -Synuclein-Antikörpers (15G7, ZNP, München, Deutschland) über Nacht bei 4 °C geschwenkt, viermal für 15 min in PBS-Tween gewaschen, für 1h in einer Lösung des in PBS-Tween-verdünnten Sekundär-Antikörpers (AP-gekoppelter Ziege-anti-Ratte-Antikörper) geschwenkt und zuletzt nochmals viermal für 15 min in PBS-Tween gewaschen. Zur Visualisierung auf der Membran wurde diese in 10 ml Alkalische Phosphatase-(AP)-Puffer - versetzt mit 45 μ l NBT (75 mg/ml in 75 % DMF)- und 35 μ l BCIP (50 mg/ml in 100 % DMF)-Lösung - geschwenkt. Die Reaktion wurde nach Erreichen einer adäquaten Proteinbandenintensität durch Spülen mit großen Mengen H₂O abgestoppt.

2.8. Aggregationsansatz

Vor dem Beginn eines jeden Experiments wurden die mit Alexa488- und mit Alexa647-markierten α -Synucleinfraktionen in 50 mM NaPi-NP-40 pH 7,0 bzw. 50 mM Tris-HCl-NP-40 pH 7,0 geeignet verdünnt und mit Hilfe von FCS- und SIFT-Messungen einer Qualitätskontrolle unterzogen. Die markierten α -Synucleinmonomere konnten somit hinsichtlich der Diffusionszeit, der Konzentration und der Partikelhelligkeit getestet und darüber hinaus die Anwesenheit präformierter Aggregaten in der Stammlösung untersucht werden. Waren Aggregate bereits in der Stammlösung vorhanden, wurde das Aliquot verworfen und nicht für den Aggregationsansatz verwendet. Im Anschluss an die Qualitätskontrolle wurde eine fünffach α -Synucleinammlösung, bestehend aus einer Mischung von Alexa488- und Alexa647-markierten α -Synucleinmonomeren, in 50 mM NaPi bzw. 50 mM Tris-HCl pH 7,0 angesetzt. Die Endkonzentrationen der fluoreszenzmarkierten α -Synucleinmonomere wurden jeweils auf 5-10 Moleküle pro Fokusvolumen eingestellt, was circa einer Konzentration von 10-20 nM entspricht. Die Aggregationsexperimente wurden mit der Zugabe der α -Synucleinammlösung in die entsprechenden Aggregationsansätze gestartet. Die Aggregationsansätze mit einem Endvolumen von 20 μ l setzten sich aus 50 mM NaPi pH 7,0 oder aus 50 mM Tris-HCl pH 7,0 in Gegenwart von 0 % bis 50 % Ethanol (V/V) zusammen. FeCl₃, AlCl₃, CuCl₂, MnCl₂ und CaCl₂ wurden in einer Endkonzentration von 0,1 μ M bis 100 μ M benutzt. In einigen Experimenten wurde Dimethylsulfoxid (DMSO) anstelle von Ethanol eingesetzt, um die α -Synucleinaggregation zu induzieren. Zudem wurden in einigen Experimenten Natriumascorbat, Desferroxamin, NP-40 (Igepal), bovines Serumalbumin (BSA), Sodiumdodecylsulfat (SDS), Triton X, Tween oder Pluronic dem Reaktionsansatz beigefügt. Die BSA-Stammlösung wurde W/V hergestellt und in den

Reaktionsansätzen verwendet. Alle Experimente wurden in Messplatten (Evotec-Technologies/Perkin Elmer, Hamburg, Deutschland) mit 96 Probennäpfchen durchgeführt. Um Verdunstungsprozessen entgegenzuwirken, wurden die Messplatten mit Klebefolie verschlossen. Typischerweise wurde die Aggregation für zwei bis fünf Stunden in zwei bis fünf unabhängigen Aggregationsansätzen pro Versuchsgruppe bei Raumtemperatur verfolgt.

2.9. Wirkstofftestung

Um die potentiell aggregationshemmende Wirkung von ausgewählten N'-Benzyliden-Benzohydrazide (NBB) Substanzen, Baicalein, Rifampicin, Curcumin, (-)-2-Amino-6-n-Propylamino-4,4,5,6,7-Tetrahydrobenzo-Thiazol und (+)-2-Amino-6-n-Propyl-amino-4,4,5,6,7-Tetrahydrobenzo-Thiazol zu testen, wurde der beschriebene *in vitro* Aggregationsansatz (vgl. Material und Methoden 2.8.) verwendet. Hierfür wurden die Substanzen als Stammlösungen mit einer Konzentration von 10 mM in 100 % DMSO gelöst. Während die Negativkontrolle die Aggregation in Gegenwart des verwendeten Puffers (50 mM NaPi pH 7,0) darstellte, wurde in der Positivkontrolle die Aggregation des α -Synucleins durch Zugabe von DMSO mit einer Endkonzentration von 1 % induziert. Die zu testenden Substanzen wurden zeitgleich zusammen mit dem DMSO zugefügt und besaßen im Aggregationsansatz in Gegenwart von 1 % DMSO eine Endkonzentration von 10 μ M bei einem Gesamtansatzvolumen von 20 μ l. Die Messung der Oligomerisierung in den Ansätzen Negativkontrolle (0 % DMSO), Positivkontrolle (1 % DMSO) und Substanzansatz (1 % DMSO plus 10 μ M Substanz) erfolgte üblicherweise jeweils in einer Dreifachbestimmung und wurde über eine Zeitdauer von 5 Stunden verfolgt. Für den jeweiligen Reaktionsansatz betrug die gescannte Einzelmesszeit jeweils 10 Sekunden. Für die Analyse wurden i.d.R. die Mäander entsprechend der Zeitspanne drei bis fünf Stunden nach Starten der Reaktion, die das Plateau der Aggregation darstellten, ausgewählt.

2.7. CD-Spektroskopie

Die Circular Dichroismus Spektren (CD-Spektren) wurden mit einem Jasco J 715 Spektropolarimeter unter Verwendung einer Quarzzelle mit 1 mm Flüssigkeitsschichtdicke (110 QS, Hellma Optik, Jena, Deutschland) bei Raumtemperatur aufgenommen. In einem Reaktionsvolumen von 200 μ L wurden sowohl Alexa647-markiertes als auch unmarkiertes α -Synuclein (150 μ g/ml) in Gegenwart von 50 mM NaPi pH 7,0 bzw. 50 mM Tris-HCl pH 7,0 und verschiedenen Ethanolkonzentrationen (0 %, 5 %, 20 %, 30 %) für 10-15 min in einem

1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß inkubiert. Darauffolgend wurden die 200 µL Probenvolumen in die Quarzelle gefüllt und das CD-Spektrum gemessen. Es wurden jeweils fünf Aufnahmen bei Wellenlängen von 195-250 nm, einer Aufnahmegeschwindigkeit von 50 nm pro Minute und einer Auflösung von 2 nm gefertigt. Zudem wurde für jede verwendete Pufferlösung ein Leerspektrum aufgenommen und dieses von dem korrespondierendem α -Synucleinspektrum abgezogen [136,153,193].

2.10. Thioflavin T Messungen

Die Thioflavin T (ThT) Messungen wurden ausgehend von einem publizierten Protokoll [136] modifiziert und teils selbständig, teils in Zusammenarbeit mit der AG Marcus Kostka (Boehringer-Ingelheim) in Biberach durchgeführt. α -Synuclein mit einer Konzentration von 0,5-1 mg/ml wurde in einer Pufferlösung bestehend aus 20 mM Tris-HCl und 0,1 M NaCl (pH 7,4) sowie 20 µM ThT inkubiert. Analog zum fluoreszenzspektroskopisch untersuchten Aggregationsansatz (vgl. Material und Methoden 2.8.) wurden Ethanol, DMSO, FeCl₃ oder NP-40 zugesetzt. Das Ansatzvolumen von 150 µl wurde in eine 96well-Messplatte (BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland) mit durchsichtigem Plattenboden pipettiert und jeder Probe ein teflonüberzogener, magnetischer Rührfisch (Durchmesser 4 mm) hinzugefügt. Um der Evaporation entgegenzuwirken wurde die Platte mit einer Klebefolie verschlossen und anschließend bei 37 °C unter konstantem Schütteln bei 540 rpm in einem Ascent Fluoroscanner Messgerät (Fluoroscanner Ascent FL, Thermo Labsystems, Langenselbold, Deutschland) für bis zu 72 Stunden inkubiert. Alle 15 Minuten wurde für 100 ms die Fluoreszenz durch den Boden der Messplatte gemessen. Die Anregungswellenlänge betrug dabei 450 nm und die Emission wurde bei 490 nm aufgezeichnet. Die Messung erfolgte in Zwei- bzw. Dreifachansätzen. Die so gewonnenen Daten wurden für die Auswertung gemittelt.

2.12. Rasterkraftmikroskopie (Atomic Force Microscopy)

Neben der Einzelmolekülspektroskopie wurde für eine zusätzliche Validierung der Aggregationsprozesse auf Einzelpartikelebene die Rasterkraftmikroskopie verwendet. Die Proben wurden analog zu dem in Abschnitt 2.8. beschriebenen Aggregationsansatz durch Udo Heinzelmann (Boehringer-Ingelheim GmbH, Biberach, Deutschland) im Auftrag angesetzt und vermessen. Dabei wurden unmarkiertes bzw. Alexa647-markiertes α -Synuclein mit einer Konzentration von 50 nM in 50 mM NaPi pH 7,4 in Gegenwart von 0 %, 20 % Ethanol bzw. in Gegenwart von 20 % Ethanol mit 20 µM FeCl₃ für vier Stunden bei Raumtemperatur

inkubiert. Danach wurden die Proben vorsichtig durchgemischt und in 5-6 μL Aliquots auf frisch gespaltene Micaplättchen (Muscovite, Veeco Europe, Dourdan Cedex, Frankreich) gegeben und für 80-90 sec inkubiert. Die Micaplättchen fungieren dabei als Probenhalter und dienen der Immobilisierung von Probenmaterialien. Danach wurde das Micaplättchen vorsichtig mit 100 μL deionisiertem, gefiltertem Wasser gespült, um Salzurückstände und locker gebundene Proteinrückstände zu entfernen. Die Micaplättchen wurden mit trockenem Stickstoffgas getrocknet. Die Bilder der Rasterkraftmikroskopie wurden mit einem AFM MultiModeTM SPM (Veeco, Mannheim, Deutschland) gewonnen, das mit einem E-Scanner ausgestattet war und im Tapping-Mode für den Nachweis von Proteinaggregaten zum Einsatz kam. Für die Messungen unter trockenen Bedingungen wurde der AFM-Messspitzentyp FESP verwendet (Veeco-Probes, Tapping Mode Etched Silicon, Dourdan Cedex, Frankreich). Die jeweiligen Bilddaten setzten sich aus 512x512 Bildpunkten (Pixel) zusammen bei einer Bildfläche von 2x2 μm . Die typischen Einstellungen der Rasterkraftmikroskopie waren: Eine freie oszillierende Amplitude mit 0,8-1,8 V; eine Antriebsfrequenz von 65-80 kHz; ein Amplitudensollwert von 300-600 mV und Scan-Raten von 0,5-1,4 Hz. Die Messungen wurden bei 21-23 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 39-42 % durchgeführt [24,41].

2.11. Präparation von kleinen unilamellaren Vesikeln

Zunächst wurden 4 mg Phospholipide (1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholin (POPC) bzw. Dipalmitoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholin (DPPC)) in 1 ml Chloroform gelöst und mit 40 μl β -Bodipy-PC (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in Chloroform gelöste Fluorescein markierte Phosphatidylcholinfettsäuren) gemischt. Das Lösungsmittel dampfte unter konstanter Stickstoffzufuhr ab und der Lipidfilm trocknete für 2 h im Vakuum. Die getrockneten Phospholipide wurden danach in 1 ml ITC-Puffer (20 mM NaPi, 100 mM KCl, pH 7,4) resuspendiert und eine Stunde hydratisiert. Die verschiedenen Lipidsuspensionen wurden anschließend auf 1 mM mit ITC-Puffer verdünnt und 2 x 20 Minuten unter konstanter Argonzufuhr sowie mindestens 5 °C über der jeweiligen Phasenübergangstemperatur (T_m) sonifiziert. Für DPPC betrug die Sonifizierungstemperatur 45 °C ($T_m \approx 37$ °C) und für POPC 22 °C ($T_m \approx -5$ °C). Zur Ultraschallbehandlung diente ein Branson Ultraschallstab (Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, USA), welcher in die Suspension ragte. Die Intensität der Beschallung betrug 30 %. Nach der Beschallung wurden die Lipidvesikel sofort in ITC-Puffer auf eine Endkonzentration von 100 μM verdünnt, um spontane Vesikelfusionen zu minimieren. Zum Vergleich wurden parallel zu den POPC-Schallvesikeln (POPC-SUV) auch

POPC-Extrudervesikel (POPC-EV) hergestellt. Dabei wurde die POPC-Lipidsuspension nach fünfmaligem Einfrieren in flüssigem Stickstoff und konsekutivem Auftauen 20mal bei RT manuell durch eine Extruderapparatur mit einem Polycarbonatfilter mit 50 nm Porengröße (LipoFast™, Armatis GmbH, Weinheim, Deutschland) gepresst. Der Vesikelpräparation schloss sich eine Qualitätskontrolle an, in der die Größe bzw. der Durchmesser der Vesikel überprüft wurden. Hierfür fand die dynamische Lichtstreuung (engl. „dynamic light scattering“, DLS) Einsatz, bei der 50 µl der POPC-EV-, POPC- oder DPPC-SUV-Stammlösung in eine Glasküvette (2 mm Spaltküvette, Hellma Optik, Jena, Deutschland) zu pipettieren waren. Der hydrodynamischen Radius der Vesikel wurde mit einem Gerät zur dynamischen Lichtstreuung (engl. „high performance particle sizer“, Malvern Instruments, Herrenberg, Deutschland) bestimmt. Die Messdauer für eine Einzelmessung in der dynamischen Lichtstreuung betrug 30 min. Die Größenverteilung der Lipidvesikel wurde mittels eines Softwareprogramms (Malvern Instruments, Herrenberg, Deutschland) ausgewertet. Die durchschnittliche Größe der Vesikel betrug dabei ca. 30 nm für die Schall- und 50 nm für die Extrudervesikel.

2.13. Elektrophysiologie mit planaren Lipid-Bilayer-Membranen

Um zu untersuchen, ob die in meinem Aggregationsansatz generierten Oligomerspezies in der Lage sind, in Lipidmembranen zu inserieren und ionenpermeable Poren zu bilden, wurden mit den von mir zusammengestellten Materialien (markiertes und unmarkiertes α -Synuclein, Chemikalien, Antikörper) im Auftrag durch Herrn Dr. Wirth von der Firma Ionovation GmbH in Osnabrück entsprechende Analysen durchgeführt.

2.13.1. Elektrophysiologie - Einzelporenmesstechnik

Die planaren Lipid-Doppelschichtmembranen (engl. „lipid bilayer“) wurden mit Hilfe der Painting-Technik [134] erzeugt. Hierbei wurde 1-3 µl von 80 mg/ml gereinigtem Azolectin (Ionovation GmbH, Osnabrück, Deutschland) [70], welches in n-Decan (Ionovation GmbH, Osnabrück, Deutschland) gelöst wurde, auf ein Loch von 100 µm Durchmesser in einem Teflonseptum appliziert, das wiederum ein 2-Kammersystem von jeweils 3 ml Fassungsvermögen trennte (Abb. 2.6.). Die Kammern waren mit 250 mM KCl, 20 mM Mops-Tris-Puffer pH 7,0 (Ionovation GmbH, Osnabrück, Deutschland) gefüllt und beinhalteten jeweils einen magnetischen Rührfisch. Durch kontinuierliches Senken und Anheben des Flüssigkeitsspiegels in einer der beiden Kammern wurde die Lipidmembran innerhalb des Loches allmählich ausgedünnt, bis sich ein Lipidbilayer gebildet hatte. Dieser Vorgang der

Lipidbilayer-Entwicklung wurde optisch mittels einer kleinen auf das Teflonseptum gerichteten Kamera und mit Hilfe von Kapazitätsmessungen kontrolliert. Die so erzeugten Lipid-Bilayer-Membranen hatten typischerweise eine Kapazität von $0,5 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ und einen Widerstand von mehr als $100 \text{ G}\Omega$. Das Rauschen betrug 3 pA (r.m.s., engl. „root mean square“) bei einer Bandbreite von 5 kHz . Nachdem sich eine stabile Lipidmembran gebildet hatte, wurden die in beiden Kammern vorherrschenden symmetrischen Bedingungen (250 mM KCl , $20 \text{ mM Mops-Tris-Puffer pH } 7,0$ (Ionovation GmbH, Osnabrück, Deutschland)) durch sanfte Perfusion in asymmetrische Bedingungen ($250 \text{ mM}/20 \text{ mM KCl}$, $10 \text{ mM Mops-Tris pH } 7,0$ (Ionovation GmbH, Osnabrück, Deutschland)) ausgetauscht und die Kammern darauffolgend in *cis/trans* unterschieden. Der sich daraus ergebende osmotische Gradient ist, neben der Notwendigkeit einer offenen Pore in einem Membranvesikel, eine Grundvoraussetzung für die Fusion von Membranvesikeln in eine Lipidmembran [202]. Um die Bindung der Membranvesikel an die Lipidmembran zu fördern, wurde CaCl_2 mit einer Endkonzentration von 10 mM in die *cis* Kammer pipettiert [139,213]. Die Membranvesikel wurden in Gegenwart von verschiedenen Komponenten analog zum FCS-Aggregationsansatz mit und ohne α -Synuclein inkubiert (Präparation vgl. 2.13.2.). Danach wurden die Membranvesikel vorsichtig direkt unter die Lipidmembran in die *cis* Kammer appliziert, was zu einem langsamen Fluss von Membranvesikeln entlang der Lipidmembran führte. Während des gesamten Versuches befand sich in jeder Kammer eine Ag/AgCl -Elektrode mit einer 2 M KCl -Agar Brücke zum jeweiligen Puffersystem. Die Elektrode der *trans* Kammer war direkt an einen Stromverstärker (Axon Gene Clamp 500, Axon Instr., USA) gekoppelt. Die im Ergebnisteil (vgl. 3.9.) angegebenen Membranpotentiale beziehen sich auf die *trans* Kammer. Die verstärkten Stromflüsse wurden mit einem Probenzeitintervall von $0,2 \text{ ms}$ digitalisiert, danach mit einem Tiefenpassfilter bei 5 kHz gefiltert und zuletzt in einen Digidata 1200 A/D Wandler (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) eingespeist. Für die Analyse der Daten wurde die Analysesoftware „SCIP“ (Single channel investigation program, Ionovation GmbH, Osnabrück, Deutschland) zusammen mit Origin 6.0 (Microcal Software Inc., USA) verwendet.

2.13.2. Präparation der α -Synucleinaggregate und Porenbildung

Alexa488-markiertes sowie unmarkiertes α -Synuclein (20 nM) wurden analog zum FCS-Aggregationsansatz in Gegenwart von präformierten Liposomen (Liposomen-Kit für Proteoliposomen, Ionovation GmbH, Osnabrück, Deutschland) unter verschiedenen Bedingungen (vgl. Tab. 5, Ergebnisse 3.9.1.) bei Raumtemperatur inkubiert. Die verwendeten

Liposomen, welche i.d.R. in einem Protein-Lipidverhältnis von 1:250 eingesetzt werden, besaßen einen mittleren Durchmesser von 100 nm. Nach drei Stunden wurden die entsprechenden Ansätze für 10 s in ein Ultraschallbad gegeben. Danach wurden die Ansätze in 1 µl Aliquots in die *cis* Kammer der Messvorrichtung pipettiert. In der *cis* Kammer befand sich ein kleiner magnetischer Rührfisch, der den Kammerinhalt durchmischte. Sofern sich innerhalb von 5 min keine Fusion zwischen den potentiell mit Poren beladenen Liposomen und der Lipidmembran ergab und somit keine Pore in der Lipidmembran integriert war, wurde ein weiteres Aliquot von 1 µl in die *cis* Kammer gegeben. Alle 30 min wurden die Lösungen in den Kammern und die Lipidmembran erneuert. Nach einer Fusion und der Bildung von Lipidmembranleckströmen wurden die Bedingungen in den beiden Kammern hinsichtlich des Puffersystems (250 mM KCl, 10 mM Mops/Tris, pH 7,0 (Ionovation GmbH, Osnabrück, Deutschland) wieder auf symmetrische Bedingungen mit 250 mM KCl angeglichen und die elektrophysiologischen Messungen durchgeführt.

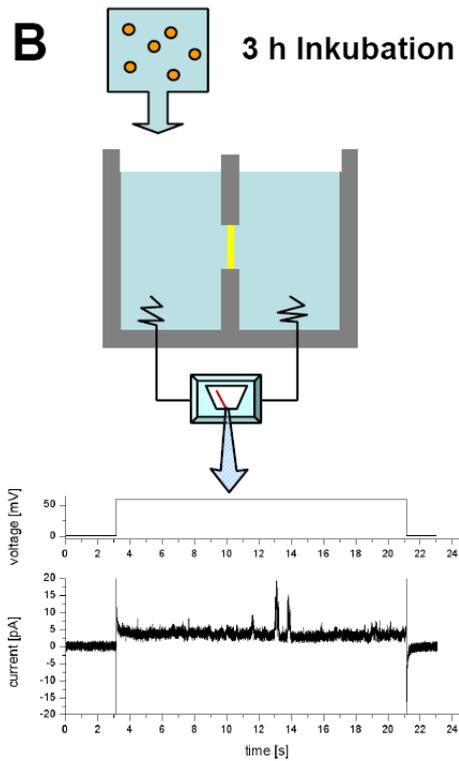


Abb. 2.6. Elektrophysiologische Analyse in einem planaren Lipidbilayersystem.
 A) Messkammer mit Teflonmembran, welche mit einem 100 μm großem Loch versehen ist, in das mittels der Painting-Technik eine plane Lipid-Doppelschicht („lipid bilayer“) eingebracht wird. B) Schematische Darstellung des gesamten Messsystems und beispielhafte Rohdatenspur.

3. Ergebnisse

3.1. Fluoreszenzmarkierung und Charakterisierung von markiertem α -Synuclein

Um die Aggregationsprozesse des α -Synucleins mittels konfokaler Einzelmolekülspektroskopie verfolgen und analysieren zu können, bedurfte es zunächst der Entwicklung und Etablierung eines effektiven Protokolls für die Markierung der α -Synucleinmonomere mit einem Fluoreszenzfarbstoff. Für die Fluoreszenzmarkierung wurde das Prinzip der Succinimidylester-Bindung ausgewählt. Succinimidylester sind in der Lage, sich an primäre Aminogruppen der im Protein enthaltenen Lysinreste und/oder an die endständige N-terminale Aminogruppe zu binden (vgl. Material und Methoden 2.3.). Mit dem Ziel, im Mittel eine Markierungsrate von ca. 2 Farbstoffmolekülen pro Monomer zu erlangen, wurde ein molares Protein-Farbstoffverhältnis von 1:2 gewählt. Die Überprüfung der möglichst vollständigen Markierung und die Charakterisierung der markierten Proteinmonomere erfolgten mittels der konfokalen Einzelmolekülspektroskopie und der Westernblotanalyse. Im Speziellen wurden die Diffusionszeit und die Partikelzahl des markierten α -Synucleins mit der FCS-Analyse evaluiert. Dabei wurde die markierte α -Synucleinstammlösung in 50 mM NaPi pH 7,0 bzw. in 50 mM Tris-HCl pH 7,0 jeweils mit 0,1 % NP-40 geeignet verdünnt und im Insight Reader analysiert. In einem 2-Komponenten-Fit wurde dabei dem Fit die bekannte Diffusionszeit des freien Farbstoffes vorgegeben und der relative Anteil von Farbstoff und markiertem α -Synuclein am Gesamtsignal bestimmt. Als weitere Parameter wurden die Partikelzahl, die Diffusionszeit, die molekulare Helligkeit (CPP) des α -Synucleins und die Gesamtfluoreszenz (I_{tot}) analysiert. In der Tab. 3.1. ist beispielhaft das Ergebnis der Qualitätskontrolle einer Markierungsreaktion dargestellt:

Tab. 3.1. Qualitätskontrolle des frisch markierten α -Synuclein.

	Partikelzahl [N]	Farbstoff [μ sec]	Farbstoff [%]	α -Syn [μ sec]	α -Syn [%]	CPP [kHz]	I_{tot} [kHz]
α -Syn-488	2,26	155	5,47	669,88	94,53	25,02	56,93
α -Syn-647	3,02	268	3,79	1020,16	96,21	24,41	73,66

Um präformierte Aggregate auszuschließen wurde im Anschluss an die Charakterisierung der Proteinmonomere eine SIFT-Messung mit mobilem Lasermessfokus durchgeführt. Im Falle von detektierbaren Aggregaten wurde die Lösung verworfen und nicht für die folgenden Aggregationsanalysen verwendet. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass zu Beginn dieser Promotionsarbeit für die Entwicklung des Protokolls die markierte α -Synucleinstammlösung zusätzlich in 50mM NaPi mit 0,2 % bzw. 1 % SDS für 10 min bei

95°C aufgekocht wurde, um potentiell vorhandene, präformierte Aggregate wieder aufzulösen. Anschließend erfolgte die Vermessung dieser Proben. Eine SDS-abhängige Auflösung von präformierten Aggregaten hätte sich auf die mittlere T_{diff} (Abnahme nach Kochen durch den Zerfall großer Partikel in kleinere) bzw. auf die mittlere Partikelzahl (Zunahme nach Kochen durch den Zerfall von großen Partikeln) ausgewirkt. Dies war jedoch bei einer erfolgreich durchgeführten Markierungsreaktion nicht der Fall.

Tab. 3.2. Proteinase K Verdau des markierten α -Synucleins und Berechnung der mittleren Markierungsrate.

	Vor Verdau		Nach Verdau		Ratio
	Partikelzahl	Tdiff	Partikelzahl	Tdiff	
α -Syn-488	2,28	637,46	4,34	217,37	1,90
α -Syn-647	3,03	992,57	6,54	338,88	2,16

Ein weiterer Schritt der Charakterisierung markierter α -Synucleinmonomere bestand in der Evaluierung des Markierungsverhältnisses. Mit dem Ziel, die Monomere im Mittel mit zwei Fluorophoren zu markieren, sollte einerseits sichergestellt werden, dass die fluoreszenzmarkierten Partikel ausreichend gut detektiert werden können [52,54], andererseits sollten die physikochemischen Eigenschaften des α -Synucleins möglichst wenig verändert und eine Übermarkierung verhindert werden. Die Tab. 3.2. zeigt beispielhaft den PK-Verdau (vgl. Material und Methoden 2.5.) zu der in Tab. 3.1. aufgeführten Markierungsreaktion. Das ausgearbeitete Protokoll meiner Arbeit führte somit zur effektiven im Durchschnitt zweifachen Markierung der α -Synucleinmonomere.

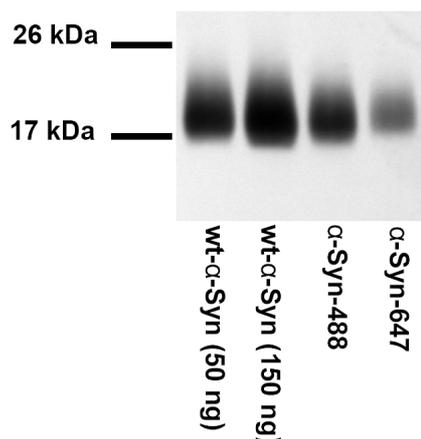


Abb. 3.1. Westernblotanalyse von markiertem und unmarkiertem α -Synuclein. Die WB-Analyse zeigt im Vergleich zwischen fluoreszenzmarkiertem und unmarkiertem, humanem α -Synuclein kein verändertes Laufverhalten im SDS-PAGE-Gel.

Als abschließende Qualitätskontrolle wurde eine Westernblotanalyse durchgeführt. Wie Abb. 3.1. zeigt, liefen sowohl das wt- α -Synuclein als auch das mit Alexa488- bzw. Alexa647-markierte α -Synuclein in einem 15 %igen SDS-Polyacrylamidgel auf der gleichen Höhe. Sowohl das unmarkierte als auch das markierte Volllängen- α -Synuclein liefen im verwendeten Gelsystem knapp oberhalb der 17 kDa Bande des als Referenz verwendeten Molekular-

gewichtstandards. Massenspektroskopische Analysen belegten jedoch, dass das für die Markierungsreaktion verwendete wt- α -Synuclein ein Molekulargewicht von 14,6 kDa besaß [116]. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Fluoreszenzmarkierung des humanen wt- α -Synucleins mit den Farbstoffen Succinimidylester-Alexa488 und Succinimidylester-Alexa647 effizient möglich ist und verlässlich funktioniert. Die Basis der Detektion und der Charakterisierung auf Einzelmolekülebene war somit geschaffen.

3.2. Etablierung eines *de novo* Aggregationsansatzes mit Ethanol als Aggregationsinduktor

Basierend auf der Annahme, dass eher kleine Oligomere als große, fibrilläre, amyloide Aggregate in der Pathogenese des Morbus Parkinson die entscheidende Rolle spielen [107,200], ist das Aggregations- und Konformationsverhalten des α -Synucleins in den vergangenen Jahren ausführlich untersucht worden. Dabei konnte gezeigt werden, dass Veränderungen der Reaktionsbedingungen, etwa ein niedriger pH-Wert, eine hohe Salzkonzentration, eine Temperaturerhöhung, die Gegenwart von Metallionen, Pestiziden, Polykationen oder Glykosaminglykanen, ferner eine hohe Proteinkonzentration oder die Verwendung organischer Lösungsmittel (z.B. Ethanol), die Aggregation und die Struktur des α -Synucleins beeinflussen [191]. Vor allem der Einsatz von Ethanol zur Aggregationsinduktion war zu Beginn dieser Promotionsarbeit von besonderem Interesse. Dies lag darin begründet, dass α -Synuclein, im Gegensatz zu anderen an neurodegenerativen Erkrankungen beteiligten Proteinen, wie z.B. dem Prionprotein [54,115], bei niedrigen Proteinkonzentrationen äußerst langsam *de novo* aggregiert. Deshalb hat auch die bisherige Literatur in ihren Aggregationsstudien überwiegend α -Synucleinkonzentrationen im mikro- bis millimolaren Konzentrationsbereich verwendet [25,45,52,192,193,196]. Allerdings stellt dies für die Untersuchung mittels konfokaler Einzelmolekülspektroskopie eine zu hohe Konzentration dar. Munishkina *et al.* konnten bei einer α -Synucleinkonzentration von 0,5-1 mg/ml (entsprechend ca. 35-69 μ M) zeigen, dass die Verwendung von organischen Lösungsmitteln, wie z.B. Ethanol, in Konzentrationen zwischen 5 und 25 %, sowohl die Bildung von partiell gefalteten Molekülen (engl. „partially folded intermediat“, PFI) induzieren als auch die Amyloidentstehung beschleunigen kann. Höhere Ethanolkonzentrationen (> 30-40 %) dagegen führten zur Formation von Aggregaten, die keine Amyloidstrukturen mehr besaßen und als sog. amorphe Aggregate bezeichnet wurden [136]. Die biophysikalische Ratio zur Verwendung eines Ethanol/Puffer-Gemisches im

Reaktionsansatz liegt darin, dass dieses System als ein Modellsystem für das Verhalten von Proteinen (α -Synuclein) in der Nähe von hydrophoben Biomembranoberflächen angesehen und genutzt werden kann, da hier eine im Vergleich zum wässrigen Milieu erniedrigte dielektrische Konstante vorliegt [136]. Bei geringen bis mittleren Ethanolkonzentrationen, die somit im gesamten Puffersystem ein biophysikalisch vergleichbares Milieu wie in der Nähe von Membranen herstellen, verändert α -Synuclein seine Konformation hin zu einem PFI, welches eine deutlich höhere Aggregationsneigung besitzt als das nativ ungefaltete Monomer. Nachdem PFIs in der Literatur als Vorstufen von Oligomeren bzw. von fibrillären Aggregaten diskutiert werden [45,107,136,192], ist es naheliegend, diese Bedingungen als ein Modellsystem einzusetzen, um Aggregationsprozesse von α -Synuclein *in vitro* zu induzieren. Basierend auf diesem Vorwissen war es zunächst von besonderem Interesse, ob und in welcher Weise sich dieser beschriebene aggregationsfördernde Effekt auch bei Verwendung einer niedrigen, d.h. nanomolaren Proteinkonzentration auswirkt.

Die Einzelmolekülanalyse von Alexa488- und Alexa647-fluoreszenzmarkiertem α -Synuclein mit einer Konzentration zwischen 10 und 20 nM in wässrigem Puffer (50 mM Napi pH 7,0) zeigte nach vierstündiger Inkubationszeit keinen Hinweis auf die Entstehung oligomerer Aggregatspezies. Die Gegenwart von mittleren Ethanolkonzentrationen (5-20 %) im Aggregationsansatz induzierte jedoch die α -Synucleinaggregation. Dies konnte mittels der Kreuzkorrelationsanalyse effektiv im Zeitverlauf verfolgt werden (Abb. 3.2. A). Unter diesen Versuchsbedingungen kam es zur Formation kleiner oligomerer Aggregate, die sowohl mit der FCS als auch mit der Kreuzkorrelationsanalyse und der FIDA-Methode detektiert und charakterisiert werden konnten. Eine quantitative Helligkeitsanalyse mittels FIDA lieferte im Vergleich zwischen den oligomeren Aggregatspezies und den α -Synucleinmonomeren bei Ethanolkonzentrationen zwischen 5 und 20 % eine deutliche Zunahme der Partikelhelligkeit (Tab. 3.3.; Ergebnisse 3.5.2.). Dabei ergab die 2-Komponentenanalyse, dass die oligomeren Aggregatspezies bei diesen niedrigen Proteinkonzentrationen aus ca. 20 α -Synucleinmonomeren bestanden. Korrespondierend zum Anstieg der Kreuzkorrelationsamplitude nahm auch die in der ungescannten FCS-Messung bestimmbare Diffusionszeit um den Faktor 2-3 zu, was die Bildung kleiner oligomerer Aggregatspezies untermauerte (Abb. 3.2. B). Parallel durchgeführte SIFT-Analysen [52] ließen in den beschriebenen Aggregationsansätzen bei einer nanomolaren Proteinkonzentration und einer Ethanolkonzentration zwischen 5 und 20 % ebenfalls nur kleine oligomere Aggregate und keine größeren bzw. amyloidartigen Aggregate erkennen (Abb.3.2. C).

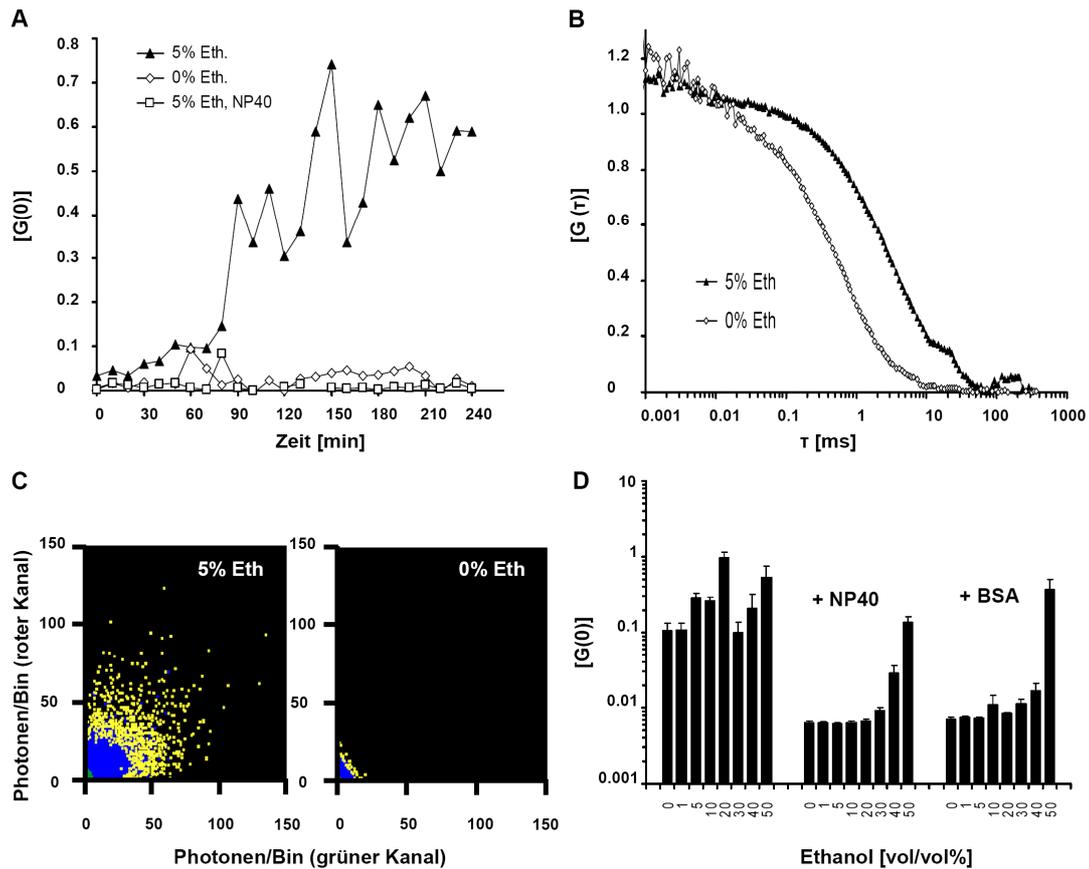


Abb. 3.2. Ethanol induziert die Oligomerbildung von α -Synuclein. A) Darstellung des Zeitverlaufs der Oligomerformation eines Reaktionsgemisches von „grün“ (Alexa488) und „rot“ (Alexa 647) markiertem α -Synuclein durch die Kreuzkorrelationsamplitude $[G(0)]$ in Reaktionsansätzen mit 5 % Ethanol (\blacktriangle), ohne Ethanol (\diamond) und in Gegenwart von 0,01 % NP-40 (\square) in ungescannten Messungen. B) Die normalisierte Auto-Korrelationskurve desselben Experiments zeigt nach 4 h Inkubation eine Zunahme der Diffusionszeit (T_{Diff}) in Gegenwart von Ethanol, entsprechend dem Bild einer Oligomerformation. C) Die Bildung kleiner oligomerer Aggregate ist ebenfalls im 2D-Intensitätsverteilungshistogramm (aus demselben Experiment) zu erkennen. D) Aggregationsfördernder Effekt verschiedener Ethanolkonzentrationen und inhibitorische Wirkung von 0,01 % NP-40 und 0,01 % BSA auf die α -Synucleinaggregation. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler der Kreuzkorrelationsamplitude nach 3,5 h Inkubation aus gescannten Messungen von 12-17 unabhängigen Versuchsansätzen.

Im Rahmen von Deaggregationsversuchen war zudem festzustellen, dass sich die bei mittleren Ethanolkonzentrationen entstandenen oligomeren Aggregatspezies komplett auflösten, sobald sie nach der Aggregation aus dem ethanolhaltigen Aggregationsansatz (z.B. 50 mM NaPi pH 7,0 mit 20 % Ethanol) in Puffermischungen verdünnt wurden, die kein Ethanol mehr enthielten (z.B. 50 mM NaPi pH 7,0 mit 0,1 % NP-40, vgl. Ergebnisse 3.3.). Die Analyse der FCS-Daten zeigte dabei im Vergleich zur Kontrolle (Verdünnung in 50 mM NaPi pH 7,0 mit 20 % Ethanol) eine Zunahme der Partikelkonzentration um etwa das 10- bis

20-fache und eine Abnahme der oligomeren Diffusionszeiten annähernd zu Diffusionszeiten von α -Synucleinmonomeren, vergleichbar dem Bild eines Zerfalls von Proteinaggregaten. Diese Daten belegen klar, dass auch bei einer α -Synucleinkonzentration von 10-20 nM der Einsatz von Ethanol als Aggregationsinduktor und der Einsatz fluoreszenzbasierter, konfokaler Einzelmolekülanalyseverfahren eine Oligomercharakterisierung erlauben und Aggregationsprozesse effizient verfolgt werden können. Bei den verwendeten submicromolaren α -Synucleinkonzentrationen wurden auch in den SIFT-Messungen keine großen, amyloidartigen Aggregate detektiert. Nachdem die Formation von amyloidartigen Strukturen bei submikromolaren α -Synucleinkonzentrationen bekanntermaßen äußerst uneffizient abläuft, gab es daher Grund zur Annahme, dass die unter den verwendeten Bedingungen entstandenen oligomeren Aggregatspezies möglicherweise kinetisch gefangen sind und nicht in größere, amyloide Aggregate weiter aggregieren können (vgl. Ergebnisse 3.5.).

3.3. Einsatz von Detergenzien und BSA im Aggregationsansatz

Die Verwendung von Detergenzien reduziert einerseits die Adsorption von Proteinen im Reaktionsgefäß, andererseits dient der Einsatz von Detergenzien auch dazu, verschiedene Aggregatspezies durch eine mögliche Detergenssensitivität bzw. -resistenz zu charakterisieren [54,86,115]. Auf Grund dessen wurde die ethanolinduzierte α -Synucleinaggregation ebenfalls in Gegenwart von NP-40, einem nicht-ionischen Detergens, verfolgt. Hierbei zeigte sich, dass die durch mittlere Ethanolkonzentrationen (5-30 %) induzierte α -Synucleinaggregation vollständig geblockt werden konnte, wohingegen die bei höheren Ethanolkonzentrationen (> 30 %) beobachtete Aggregation nicht verhindert werden konnte (Abb. 3.2. A und D). Interessanterweise beeinflusste aber nicht nur der Einsatz von Detergenzien sondern auch die Gegenwart von bovinem Serumalbumin (BSA) die Aggregationsprozesse des α -Synucleins. Kürzlich konnte nachgewiesen werden, dass BSA in der Lage ist, an die saure C-terminale Domäne des α -Synucleins zu binden [39]. Deshalb entstand die Frage, ob die Zugabe von BSA die Oligomerisierung von α -Synuclein ähnlich wie NP-40 beeinflusst, oder ob im Zuge des sog. „Molecular Crowding“ die Oligomerisierung vielleicht sogar gefördert wird [191]. In meinen Experimenten zeigte der Einsatz von 0,01 % (W/V) BSA (0,1 mg/ml) eine vollständige Blockierung der *de novo* α -Synucleinaggregation bei mittleren Ethanolkonzentrationen (5-30 %)(Abb. 3.2. D). Daraufhin wurden weitere Versuche mit Konzentrationsreihen von NP-40, BSA und weiteren Detergenzien (SDS, TWEEN, Triton X,

Pluronic) durchgeführt, die allesamt eine konzentrationsabhängige Blockierung der *de novo* α -Synucleinaggregation im FCS-Aggregationsansatz zeigten (Abb. 3.3.). Dieser durch Detergenzien und BSA beeinflussbare Aggregationsweg bei mittleren Ethanolkonzentrationen bestätigte somit auch auf Einzelmolekülebene die von Munishkina *et al.* publizierten Daten, dass in Abhängigkeit verschiedener Ethanolkonzentrationen unterschiedliche oligomere Aggregatspezies erzeugt werden können. Gleichzeitig kann diese Beobachtung als Modellsystem für weitere Aggregationsstudien verwendet werden. Auf Grund dieser Ergebnisse wurden die folgenden dargestellten Versuche und die Markierungsreaktion ohne Zusatz von Detergenzien durchgeführt und in Kauf genommen, dass ein Teil des eingesetzten Proteins durch Adsorptionsprozesse verloren geht.

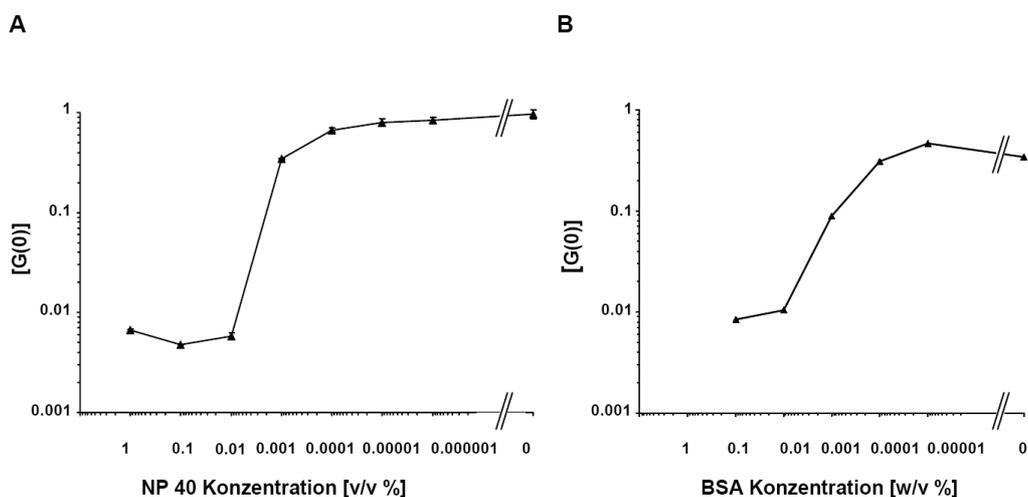


Abb. 3.3. Inhibition der α -Synucleinoligomerbildung durch NP-40 (A) und BSA (B) in direkter Dosis-Wirkungsbeziehung. Die Aggregation wurde im Ansatz mit markiertem (Alexa488 und Alexa647) α -Synuclein in Gegenwart von 20 % Ethanol und verschiedenen NP-40- bzw. BSA-Konzentrationen verfolgt. Dargestellt ist der Mittelwert der Kreuzkorrelationsamplitude [G(0)] mit Standardfehler von Dreifachbestimmungen aus gesamteten Messungen nach 3-4 h Inkubation.

3.4. CD-Spektroskopie von markiertem und unmarkiertem α -Synuclein

Die beschriebenen ethanolabhängigen Faltungs- bzw. Aggregationsprozesse konnten auch mittels der CD-Spektroskopie verfolgt werden. Während α -Synuclein (10 μ M) ohne Zusatz von Ethanol die natürliche ungefaltete Sekundärstruktur (engl. „random coil“) aufwies, zeigte sich in Gegenwart von 30 % Ethanol bereits nach einer kurzen Inkubationszeit von 15 min ein Übergang in eine β -faltblattreiche Sekundärstruktur. Im Gegensatz zu den durchgeführten Einzelmolekülmessungen bei nanomolaren Proteinkonzentrationen zeigte der Einsatz von 5 % Ethanol in der CD-Spektroskopie noch keine Hinweise auf eine beginnende Aggregation, was

sich erwartungsgemäß in einer Veränderung der Sekundärstruktur angedeutet hätte. Dies änderte sich auch nicht während der Inkubationszeit von bis zu 2 h. Die Anwesenheit von 20 % Ethanol im Reaktionsansatz der CD-Spektroskopie führte jedoch zu einer partiellen Faltungsveränderung des α -Synucleins, was auch von Munishkina *et al.* als „partially folded intermediate“ (partiell gefaltetes Aggregationsintermediat) so beschrieben wurde und sehr gut reproduzierbar war (Abb. 3.4.).

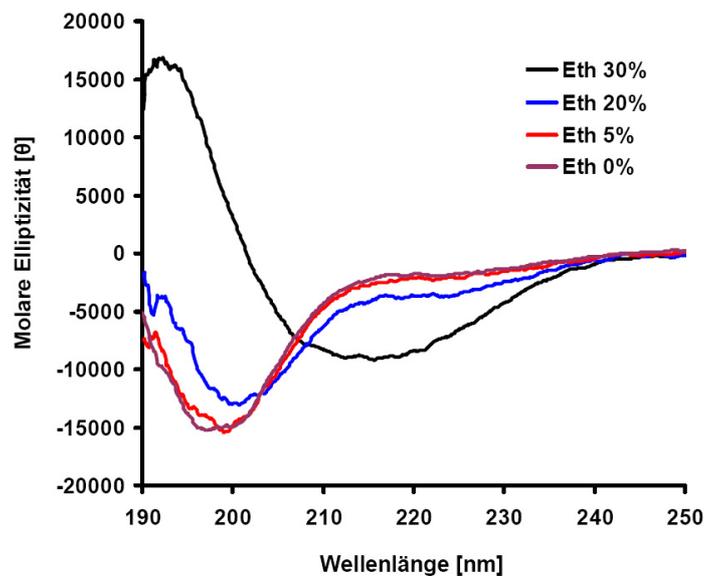


Abb. 3.4. CD-Spektroskopie von α -Synuclein in Gegenwart von Ethanol.

Das CD-Spektrum von α -Synuclein (0,15 mg/ml) wurde in Gegenwart von 0 %, 5 %, 20 % und 30 % nach einer Inkubation von 15 min bestimmt. Dabei zeigte sich ein Übergang der Sekundärstruktur in Abhängigkeit der Ethanolkonzentration von einem ungefalteten Zustand („random coil“) hin zu einer β -Faltblattstruktur („ β -sheet“). Bei mittleren Ethanolkonzentrationen fand sich eine Zwischenform, vereinbar mit einer partiellen Faltungsveränderung („partially folded intermediate“).

Nachdem diese partiellen Faltungsveränderungen als Vorstufe für die Entwicklung von Oligomeren bzw. β -faltblattreichen Aggregaten angesehen werden [45,136,192], war dies ein weiterer Grund dafür, mittels geringer bis mittlerer Ethanolkonzentrationen die Aggregation von α -Synuclein zu induzieren. Sowohl Versuche mit markiertem als auch mit unmarkiertem α -Synuclein lieferten in diesen Messungen gleichartige Ergebnisse, was den Schluss nahelegt, dass die Fluoreszenzmarkierung die Eigenschaften des α -Synucleinmonomers nicht wesentlich verändert. Die notwendigen hohen Proteinkonzentrationen und die lange Messdauer ließen die CD-Spektroskopie im Vergleich zur Einzelmolekülanalyse allerdings nur als ergänzende Methode in Erscheinung treten, um die Ziele dieser Arbeit zu erreichen.

3.5. Einsatz von Metallionen

3.5.1. Metallionenscreening

Im Anschluss an die Generierung kleiner oligomerer Aggregatspezies im FCS-Aggregationsansatz mittels Ethanol als Aggregationsinduktor, war das nächste Ziel, Einflussfaktoren zu finden, die die Aggregation unter diesen Bedingungen und bei den verwendeten nanomolaren Proteinkonzentrationen weiterbringen und möglicherweise die Entstehung andersartiger, größerer Aggregate fördern könnten. Epidemiologische Untersuchungen deuten darauf hin, dass Metallionen in der Pathogenese verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen eine Rolle spielen [48,62,208]. Bei Morbus Parkinson Patienten wurde sowohl *ante* als auch *post mortem* ein erhöhter Eisengehalt in der Substantia nigra beschrieben [10,32,177]. Auf molekularer Ebene konnte gezeigt werden, dass Metallionen wie Eisen oder Aluminium *in vitro* die Bildung oligomerer Aggregatspezies sowie die Amyloidbildung fördern [23,193]. Im Gegensatz zu anderen Forschungsgruppen [193], die eine Kombination aus einer wesentlich höheren Protein- (μM) und Metallionenkonzentration (mM) verwendeten, wurde in meiner Arbeit der Einfluss verschiedener Metallionen, insbesondere Eisen nahe des physiologischen Serumlevels ($5\text{-}30\ \mu\text{M}$), auf den Aggregationsprozess bei nanomolaren Proteinkonzentrationen getestet. Zunächst wurden verschiedene zwei- und dreiwertige Metallionen im beschriebenen FCS-Aggregationsansatz verwendet. Hierbei zeigten von allen geprüften Metallionen nur Fe^{3+} und Al^{3+} eine deutliche quantitative Aggregationssteigerung. In den gescannten SIFT-Messungen fiel dabei im Vergleich zur Kontrolle ($50\ \text{mM}$ Napi pH 7,0) und zur reinen ethanolabhängigen Oligomerinduktion ($50\ \text{mM}$ Napi pH 7,0 mit 20 % Ethanol) die Entstehung einer deutlich helleren und somit größeren Aggregatspezies auf (Abb. 3.5. A-C). Die Anwesenheit von Metallionen im NaPi-Puffer allein, ohne Ethanol als Aggregationsinduktor, führte zu keiner Aggregationssteigerung.

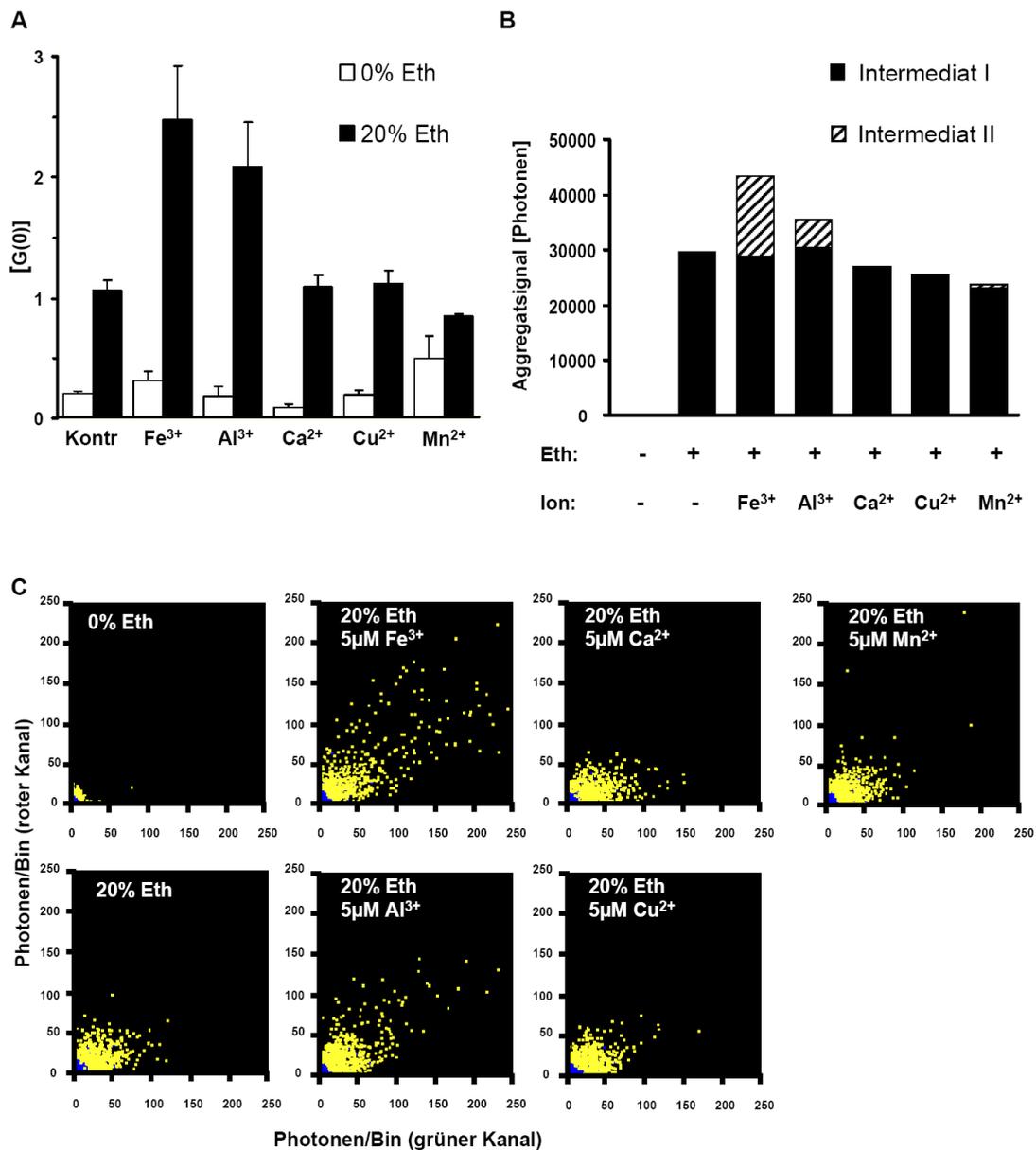


Abb. 3.5. Effekt von Fe³⁺ und anderen Metallionen auf die α -Synucleinligomerisierung.

A) Die Aggregation eines Gemisches von Alexa488- und Alexa647-markiertem α -Synuclein wurde durch die Kreuzkorrelationsanalyse [G(0)] ohne Ethanol (weiße Balken) und mit 20 % Ethanol (schwarze Balken) in Gegenwart von 5µM FeCl₃, AlCl₃, CaCl₂, CuCl₂ oder MnCl₂ bzw. ohne Metallionen bestimmt. Die Daten stellen den Mittelwert mit Standardfehler in Dreifachansätzen nach 4h dar. B) Quantitative SIFT-Analyse der Photonenzahl der Punktwolken aus denselben Reaktionsansätzen wie in Abbildung A. Die Schwellenwerte für Intermediat I (schwarze Balken) und Intermediat II (gestreifter Balken) wurden aus Kontrollmessungen für das Intermediat I bei: 20/20 < x < 150/110 und für das Intermediat II bei: x > 150/110 gesetzt. C) Die 2D-Intensitätsverteilungshistogramme korrespondierend zur quantitativen Analyse (A und B) zeigen den synergistischen Effekt der dreiwertigen Metallionen.

3.5.2. FeCl₃-Effekt auf die Aggregation

Nachdem die Zugabe von Fe³⁺ (und in geringerem Ausmaß Al³⁺) im ethanolabhängigen FCS-Aggregationsansatz zur Bildung von deutlich größeren, oligomeren Aggregaten führte, die in der SIFT-Analyse als hochintense Signalpunkte (Bins) im Rahmen von gescannten Messungen detektiert werden konnten (Abb. 3.5. C), war das nächste Ziel, diese Aggregate auch auf Einzelmolekülebene zu charakterisieren. Die quantitative Analyse der metallioneninduzierten Aggregate hinsichtlich ihrer Diffusionszeiten ist in diesem Falle nicht sinnvoll, da große Aggregatpartikel im Vergleich zu α -Synucleinmonomeren wesentlich langsamer durch die Lösung diffundieren. Ein stationärer Lasermessfokus, wie er für Diffusionszeitmessungen notwendig ist, wäre daher im Vergleich zu den gescannten Messungen äußerst uneffizient, um seltene bzw. langsam diffundierende, große Aggregate statistisch repräsentativ zu erfassen und zu analysieren. Für die Bestimmung der Aggregatsgröße boten sich daher vor allem Helligkeitsanalysen mittels FIDA aus den gescannten Messungen an.

Tab. 3.3. Detaillierte quantitative FIDA-Analyse der Aggregatkonzentrationen und der Aggregathelligkeiten für das Experiment dargestellt in Abb. 3.5.. Während Kanal 1 die Ergebnisse für α -Synuclein markiert mit Alexa488 (= „grün“) darstellt, liefert Kanal 2 die Ergebnisse für α -Synuclein markiert mit Alexa647 (= „rot“). Die Helligkeit (Q1) und Konzentration (C1) für monomeres α -Synuclein wurden aus Kontrollmessungen ohne Ethanol und Fe³⁺ bestimmt. Diese Daten wurden für die 2-Komponenten FIDA-Analyse benützt, um die Charakteristika der Aggregatspezies zu berechnen (Aggregathelligkeit: Q2 und Aggregatkonzentration: C2). Die Daten entsprechen dem Mittelwert von drei unabhängigen Messungen nach 4 h Inkubation.

Kanal 1	Ansatz	C1 (Partikel/ Fokusvolumen)	Q1 (kHz)	C2 (Partikel/ Fokusvolumen)	Q2 (kHz)
Ein-Komponenten-Fit	0 Eth	0,32	29,72	-	-
	0 Eth 5 μ M Fe ³⁺	0,40	29,72	-	-
Zwei-Komponenten-Fit	20 Eth	0,39	29,72	0,0054	259,69
	20 Eth 5 μ M Fe ³⁺	0,53	29,72	0,00051	2484,54
Kanal 2	Ansatz	C1 (Partikel/ Fokusvolumen)	Q1 (kHz)	C2 (Partikel/ Fokusvolumen)	Q2 (kHz)
Ein-Komponenten-Fit	0 Eth	0,59	23,27	-	-
	0 Eth 5 μ M Fe ³⁺	0,61	23,27	-	-
Zwei-Komponenten-Fit	20 Eth	0,81	23,27	0,0091	161,11
	20 Eth 5 μ M Fe ³⁺	0,85	23,27	0,00094	2358,98

In Kontrollmessungen wurden für die Helligkeitsanalysen zunächst die α -Synucleinmonomerhelligkeiten für den grünen und den roten Kanal bestimmt. Dann wurden diese Werte in einem 2-Komponenten-Fit als fixe Größe eingesetzt und auf das Vorkommen oligomerer Aggregatspezies getestet. Während sich die ethanolinduzierten Oligomere angesichts ihrer im grünen und roten Bereich jeweils ca. zehnfachen Monomerhelligkeit aus mindestens ca. 20 Monomeren zusammensetzten, führte die Auswertung der eiseninduzierten Aggregate zu dem Ergebnis, dass die durch dreiwertige Metallionen induzierten oligomeren Aggregatspezies im Mittel aus mehr als 100 α -Synucleinmonomeren bestehen (Tab. 3.3.). Um diese bei unterschiedlichen Bedingungen entstandenen oligomeren Aggregatspezies im Folgenden unterscheiden zu können, wurden die kleinen ethanolinduzierten Oligomere „Intermediat I“ und die großen, metallioneninduzierten Oligomere „Intermediat II“ genannt. Interessanterweise zeigte sich der Fe^{3+} -abhängige Effekt auf die α -Synucleinaggregation nur in Gegenwart von geringen bis mittleren Ethanolkonzentrationen (5-25 %) (Abb. 3.6.). Weder trat der Fe^{3+} -Effekt unter diesen Bedingungen in Abwesenheit von Ethanol auf, noch war dieser bei Ethanolkonzentrationen > 30 % zu detektieren. In Gegenwart von BSA oder dem Detergens NP-40, deren Einsatz bereits die Bildung von Intermediat I bei mittleren Ethanolkonzentrationen blockiert hatte, blieb auch der Fe^{3+} -Effekt aus, d.h. es kam zu keiner Intermediat II Formation.

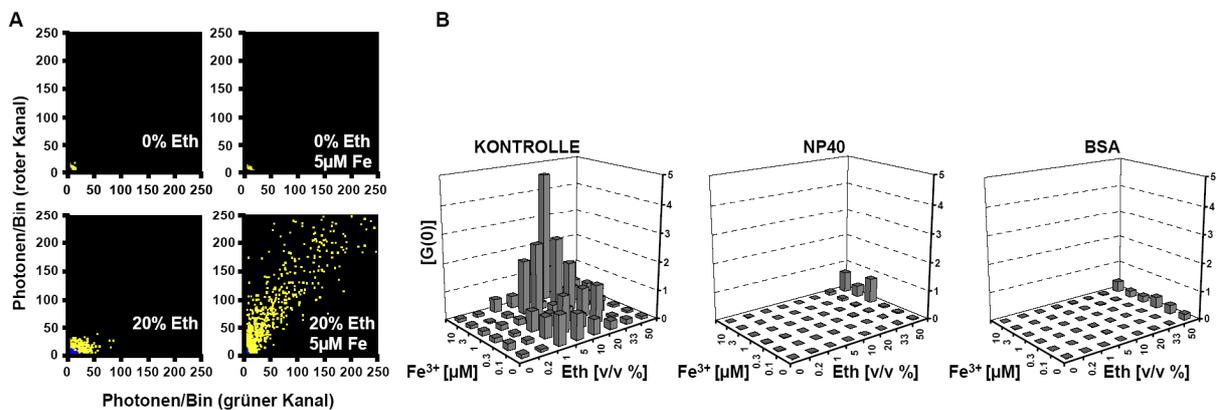


Abb. 3.6. Der Effekt von Fe^{3+} auf die α -Synucleinoligomerisierung.

A) Die 2D-Intensitätsverteilungshistogramme aus einem weiteren unabhängigen Experiment zeigt den synergistischen Effekt von Ethanol und Fe^{3+} , der die Bildung deutlich größerer Aggregate (im Vergleich zu Ethanol allein) fördert. Interessanterweise induziert Fe^{3+} allein die Aggregatbildung im verwendeten Aggregationsansatz nicht. B) Verschiedene Ethanol- und Fe^{3+} -Konzentrationen wurden systematisch mit und ohne 0,01 % NP-40 bzw. BSA getestet. Ein synergistischer Effekt auf die α -Synucleinaggregation wurde nur bei mittleren Ethanolkonzentrationen gefunden. Dieser Effekt wurde vollständig von NP-40 und BSA geblockt. Konzentrationen unter $0,1\mu\text{M}$ Fe^{3+} hatten nur einen geringen Effekt. Dargestellt ist der Median der Kreuzkorrelationsamplitude $[G(0)]$ aus gescannten Messungen nach einer Inkubationszeit von 3,5 h in 5 (Kontrolle), 2 (NP-40) und 3 (BSA) unabhängigen Experimenten.

Dieses Ergebnis unterstreicht, dass der Fe^{3+} -Effekt an die Anwesenheit von Intermediat I Aggregaten gebunden ist, was auf einen synergistischen Effekt zwischen trivalenten Ionen (wie Eisen bzw. Aluminium) und dem Aggregationsinduktor Ethanol im Rahmen der α -Synucleinaggregation schließen lässt. Auch der Einsatz von H_2O_2 (0,0007 %-1 %) u.a. in Kombination mit Ionen wie CuCl_2 (1-50 μM), mit dem Ziel, durch oxidativem Stress die Aggregation in ähnlicher Art und Weise zu fördern, lieferte hingegen in zahlreichen Versuchen auf Einzelmolekülebene keine Aggregationsförderung.

3.6. Wechsel des Puffersystems

Um zu untersuchen, ob der beschriebene ethanolabhängige Effekt und der synergistische Eiseneffekt nur im verwendeten 50 mM NaPi (pH 7,0) auftrat, wurde die Aggregation auch in 50 mM Tris-HCl (pH 7,0) verfolgt und analysiert. Hierbei zeigten sich gleichartige Ergebnisse für den Effekt von Ethanol bzw. für die Kombination Ethanol und Fe^{3+} . Insgesamt ist anzumerken, dass sich die Fe^{3+} -abhängige α -Synucleinaggregation im Tris-HCl-Puffer (pH 7,0) etwas kräftiger vollzog. Dies ist naheliegend damit zu erklären, dass möglicherweise Phosphat im NaPi-Puffer Komplexe mit den freien Eisenionen bilden kann und die freie Ionenkonzentration dadurch reduziert. (Abb. 3.7.). Zusammenfassend konnte soweit in dieser Arbeit erstmalig auf Einzelmolekülebene nachgewiesen werden, dass Fe^{3+} bei physiologisch relevanten Konzentrationen die Bildung großer oligomerer Aggregate innerhalb eines mehrschrittigen Aggregationsprozesses fördert. Ausgangspunkt waren dabei kleine oligomere Aggregatspezies, die sich in Pufferbedingungen mit einer erniedrigten di-elektrischen Konstante bilden, was in der Literatur als Modellsystem für das intrazelluläre Milieu in der Nähe von Zellmembranen postuliert wird [135,136].

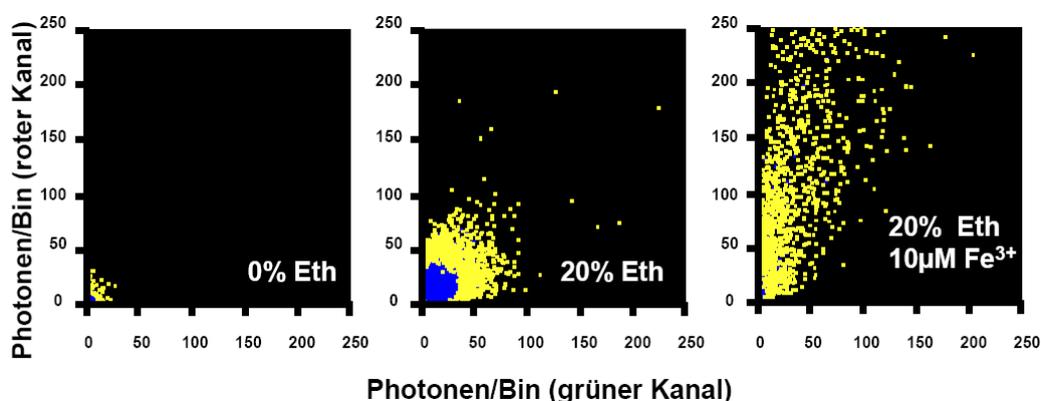


Abb. 3.7. Wechsel des Puffersystems von NaPi- zu Tris-HCl-Puffer. Aggregation von markiertem α -Synuclein wurde in 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,0 in Gegenwart von 0 % Ethanol, 20 % Ethanol und 20 % Ethanol/10 μM FeCl_3 durchgeführt. Dargestellt sind die 2D-Intensitätsverteilungshistogramme aus gescannten Messungen nach 4 h Inkubation.

3.7. Rasterkraftmikroskopie (AFM) der Intermediat I und II α -Synucleinaggregate

Um einen möglichen Einfluss der Fluoreszenzmarkierung auf den mit der konfokalen Einzelmolekülanalyse beschriebenen Aggregationsprozess auszuschließen und den Aggregationsansatz zu validieren, wurde die Rasterkraftmikroskopie (engl. „atomic force microscopy“, AFM) eingesetzt. Diese erlaubt, als fluoreszenzunabhängige Methode, ebenfalls Einzelpartikelanalysen bei niedriger Partikelkonzentration durchzuführen. In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass die AFM eine schlagkräftige Methode für die Charakterisierung von Proteinaggregaten ist [24,26]. Im Rahmen der Parkinson-Forschung wurde die AFM bereits erfolgreich zur Identifikation morphologisch verschiedener Aggregatstrukturen von α -Synuclein eingesetzt [45,108,197]. Um die in den verschiedenen Pufferbedingungen charakterisierten Partikelspezies (Monomer, Intermediat I und II) mittels der AFM zu analysieren, wurde in einem ersten Schritt unmarkiertes α -Synuclein für den Reaktionsansatz verwendet. In einem weiteren Schritt wurden identische Versuche mit markiertem α -Synuclein durchgeführt und die Ergebnisse verglichen. Die AFM-Analyse von unmarkiertem α -Synuclein, welches für 4 h bei Raumtemperatur in 50 mM NaPi pH 7,4 ohne Aggregationsinduktor inkubiert wurde, zeigte homogen verteilte Partikel mit einer durchschnittlichen Höhe von ca. 1,4 nm und einem mittleren Durchmesser von ca. 13 nm (Tab. 4). Aus der homogenen Größenverteilung der Partikel in den AFM-Bildern sowie durch den Vergleich mit AFM-Daten ähnlicher Peptide gleichen Molekulargewichts [25,157,159] wurden diese globulären Strukturen als α -Synucleinmonomere identifiziert. Das frisch in 50 mM NaPi pH 7,4 gelöste α -Synuclein behielt dabei über die untersuchte Inkubationszeit von 4 h seine Größenverteilung und Struktur. Nachdem die räumliche Auflösung der AFM-Bilder nicht ausreichend war, um eine detaillierte, strukturelle Gliederung innerhalb dieser Partikel bzw. der im Folgenden beschriebenen Aggregatspezies abzuleiten, wurde eine zylindrische Form als Modell angenommen, um das Volumen der Partikel bzw. der Aggregate näherungsweise zu berechnen. Unter dieser Annahme wurde für die monomeren α -Synucleinpartikel ein durchschnittliches Volumen von ungefähr 200 nm³ berechnet (Tab. 3.4.), ca. 80 % der Partikel besaßen ein Volumen von kleiner als 300 nm³.

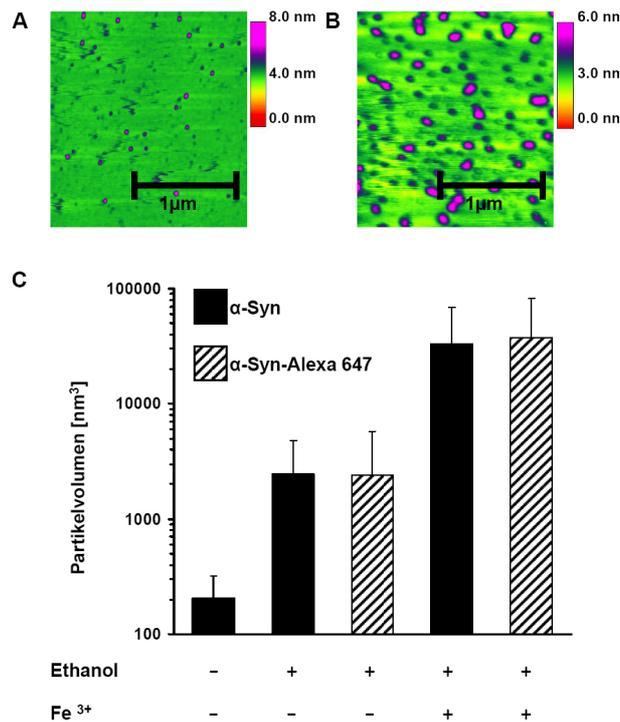


Abb. 3.8. Rasterkraftmikroskopie (AFM) von α -Synucleinoligomeren. A) Das repräsentative AFM-Bild zeigt typische Oligomere nach einer vierstündigen Inkubation von 50 nM α -Synuclein in Gegenwart von 20 % Ethanol bei RT. Die Höhe der Partikel ist farbkodiert dargestellt (s. Legende; Aufnahmen U.H. in Zusammenarbeit mit AG Dr. M.K. BI Biberach). B) AFM-Bild einer parallel inkubierten Probe von α -Synuclein in Gegenwart von 20 % Ethanol und 20 μ M FeCl₃. C) Quantitative Größenverteilungsanalyse in verschiedenen Reaktionsansätzen für markiertes (gestreifte Balken) und unmarkiertes (schwarze Balken) Synuclein (Mittelwert mit Standardabweichung, n = 20).

Der Einsatz von 20 % Ethanol im Reaktionsansatz induzierte eine deutliche Zunahme des mittleren Partikeldurchmessers auf ca. 34 nm bei einer Höhe von 2,1 nm (Abb. 3.8. und Tab. 3.4.), welches mit den Ergebnissen aus dem FCS-Aggregationsansatz hinsichtlich der Formation von Intermediat I Oligomeren korrespondiert. Das mittlere Volumen wurde mit ca. 2500 nm³ berechnet. Insgesamt waren 75 % der Partikel kleiner als 3000 nm³. Die Kombination von 20 % Ethanol und 20 μ M FeCl₃, die in den FIDA- und SIFT-Messungen die Bildung von Intermediat II Aggregaten förderte, lieferte im Durchmesser (ca. 70 nm) und in der Höhe (6,4 nm) nochmals eine deutliche Zunahme der Partikelgröße. Das berechnete Volumen dieser eiseninduzierten Intermediat II Aggregate betrug ungefähr 33000 nm³. Insgesamt waren dabei 85 % der Partikel kleiner als 50000 nm³. Um einen Einfluss der Fluoreszenzmarkierung am α -Synuclein auszuschließen, wurden die Versuche, wie bereits erwähnt, parallel dazu mit markiertem α -Synuclein durchgeführt. Die Koppelung des

Fluoreszenzfarbstoffes (Alexa647) an das Proteinmonomer hatte keinen erkennbaren Einfluss auf den Oligomerisierungsprozess und zeigte unter gleichen Reaktionsbedingungen vergleichbare Ergebnisse. Die AFM-Messungen bestätigten somit die in der konfokalen Einzelmolekülanalyse gewonnenen Ergebnisse hinsichtlich des synergistischen Effekts zwischen dem Aggregationsinduktor Ethanol und dem dreiwertigen Eisenion beim Oligomerisierungsprozess und hinsichtlich der Größe der resultierenden Aggregate relativ zum Monomer. Während Ethanol eine etwa zehnfache Zunahme der Partikelgröße (Intermediat I) induzierte, führte die Kombination von Ethanol und FeCl₃ zu einer 100-fachen Zunahme der Partikelgröße (Intermediat II) im Vergleich zum monomeren α -Synuclein. Auch die Fluoreszenzmarkierung beeinträchtigte das Aggregationsverhalten nicht.

Tab. 3.4. AFM-Analyse von α -Synucleinaggregaten. Die AFM-Daten wurden nach Inkubation von 50 nM α -Synuclein für 4 h bei RT in Gegenwart von 0%, 20 % Ethanol und 20 % Ethanol/20 μ M FeCl₃ bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert der Messungen für n = 20 Partikel. Für die Volumenberechnung wurde eine zylindrische Form angenommen.

			Ø Durchmesser [nm]	Ø Höhe [nm]	Volumen [nm³]
α-Syn	0 Eth	- Fe ³⁺	13,3	1,4	206
α-Syn	20 Eth	- Fe ³⁺	34,3	2,1	2460
α-Syn-Alexa647	20 Eth	- Fe ³⁺	27,7	2,7	2418
α-Syn	20 Eth	+ Fe ³⁺	70,1	6,4	33214
α-Syn-Alexa647	20 Eth	+ Fe ³⁺	91,9	3,7	37504

3.8. Intermediat I und II auf dem Weg zur Amyloidbildung

Die aktuelle Literatur diskutiert die Bedingungen, unter denen α -Synuclein zu einer (toxischen) oligomeren Aggregatspezies bzw. zu Amyloidfibrillen wie in den LK reagiert, sehr unterschiedlich [19,23,45,71,193]. Da eine Reihe von Faktoren, wie die Proteinkonzentration, die Pufferbedingungen, biochemische Modifikationen oder der Zusatz von Ko-Faktoren, eine entscheidende Rolle zu spielen scheinen, stellte sich zum Zeitpunkt meiner Arbeit die Frage: Sind diese speziellen Pufferbedingungen, welche bei einer nanomolaren Proteinkonzentration die Bildung von Intermediat I und II Oligomeren begünstigen, auch in der Lage, bei einer höheren α -Synucleinkonzentration die Amyloidbildung zu triggern oder zu beschleunigen? Dies würde ein Indiz darstellen, dass die Oligomerspezies, Intermediat I und II, sich möglicherweise direkt zu amyloiden Fibrillen entwickeln können, welche auch in LK oder LN zu detektieren sind. Da es nur wenige wissenschaftliche Arbeiten gibt, die die α -Synucleinaggregation auf nano- und niedrig mikromolarer Ebene mit dem Ziel untersuchten, ein schrittweises konzentrationsabhängiges

Aggregationsmodell zu entwickeln, wurde hinsichtlich dieses Fragenkomplexes ein Thioflavin T Reaktionsansatz (ThT) durchgeführt. Wie erwartet [136], beschleunigte sowohl die alleinige Zugabe von 20 % Ethanol als auch die Kombination 20 % Ethanol/100 μM Fe^{3+} die Amyloidbildung deutlich (Abb. 3.9. A und B). Im Einklang mit den Ergebnissen auf Einzelmolekülebene konnte auch im ThT-Ansatz die Aggregat- bzw. Fibrillenbildung durch den Einsatz von Detergenzien wie z.B. 0,1 % NP-40 gehemmt werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass beide Oligomerspezies, Intermediat I und II, welche auf Einzelmolekülebene mit hochsensitiven Methoden wie der FCS-, FIDA-, SIFT- und AFM-Methode detektiert werden konnten, auf einem Aggregationsweg zu Amyloidfibrillen liegen. Dies ist deutlich in der verkürzten Lag-Phase im Vergleich zur Kontrolle zu erkennen.

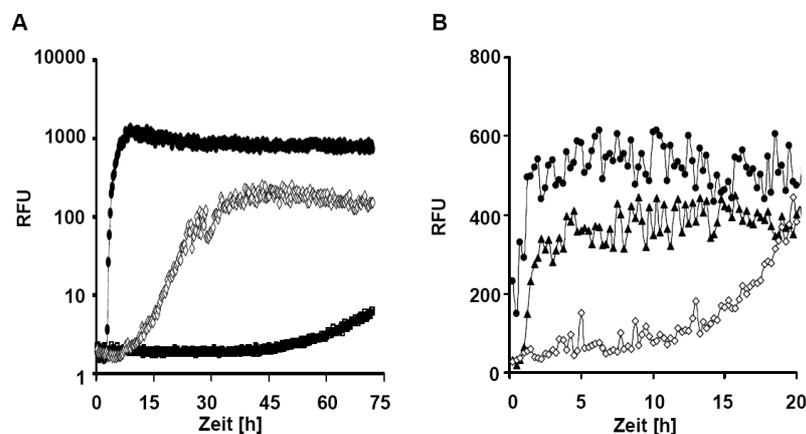


Abb. 3.9. Pufferbedingungen, die bei nanomolarer Konzentration von α -Synuclein die Bildung von Intermediat I und II Oligomeren fördern, induzieren bei höherer Proteinkonzentration die Amyloidbildung. A) Die Aggregation von unmarkiertem α -Synuclein (0,5 mg/ml) wurde bei 37°C für 72 h in einem ThT-Reaktionsansatz in Gegenwart von 0,1 % NP-40 (\square), 0 % Ethanol (\diamond) und 20 % Ethanol (\bullet) verfolgt. Korrespondierend zu den Ergebnissen der Einzelmolekülmessung beschleunigte die Gegenwart von 20 % Ethanol die Amyloidformation, wohingegen 0,1 % NP-40 die Amyloidbildung inhibierte. Dargestellt ist der Mittelwert von Zweifachbestimmungen. B) Die Aggregation von unmarkiertem α -Synuclein (0,5 mg/ml) wurde bei 37°C in einem ThT-Reaktionsansatz in Gegenwart von 0 % Ethanol (\diamond) und 20 % Ethanol (\blacktriangle) und 20 % Ethanol/100 μM Fe^{3+} (\bullet) verfolgt. Sowohl 20 % Ethanol, als auch 20 % Ethanol/100 μM Fe^{3+} beschleunigten die Amyloidbildung. Dargestellt ist der Mittelwert von Doppelbestimmungen.

Somit könnten mit Hilfe des Einzelmolekülansatzes in der FCS-, FIDA- und SIFT-Methode auf nanomolarer Ebene möglicherweise potentiell wirksame Substanzen gefischt werden, die die Aggregationsprozesse bereits im Keim ersticken und somit die Amyloidbildung hemmen. Der gleichgerichtete Effekt von NP-40 im FCS- und ThT-Aggregationsansatz kann als ein Indiz für diese Strategie angesehen werden.

3.9. Porenbildung durch eiseninduzierte Intermediat II Oligomere

3.9.1. Untersuchungen zur Porenbildung

Besonders Matthew Goldberg, Hilal Lashuel und Peter Lansbury Jr. postulierten sehr früh, dass möglicherweise ringförmige Protofibrillen die wesentliche toxische Spezies in der Pathogenese des Morbus Parkinson darstellen [61,108]. Auch konnten detergensresistente, ringförmige α -Synucleinaggregate aus Gehirngewebe von MSA Patienten aufgereinigt werden [157]. Nachdem die porenbildende Eigenschaft und eine damit verbundene Störung von Zellmembranen bzw. -organellen als charakteristisches Merkmal toxischer oligomerer Proteinaggregate aktuell in der Diskussion steht [65,95,196], war es von außerordentlichem Interesse, herauszufinden, ob die auf Einzelmolekülebene charakterisierten Intermediat I und II Oligomere ebenfalls potentiell toxische, porenbildende Eigenschaft besitzen. Um dies zu eruieren, wurde die planare Lipid-Doppelschicht-Technik (engl. „lipid bilayer technique“) eingesetzt. In den letzten Jahrzehnten erwies sich diese als eine schlagkräftige Technik, um Einzelkanalmessungen an Poren durchzuführen, die sich in künstlichen Membranen (Lipidbilayer) integriert hatten, um diese näher zu charakterisieren [130]. Analog zu dem einzelmolekülbasierten Aggregationsansatz wurde in einer Pilotstudie unmarkiertes und markiertes α -Synuclein (20 nM) für drei Stunden mit präformierten Vesikeln (Liposomen) unter verschiedensten Reaktionsbedingungen (Tab. 3.5.) inkubiert. Danach wurden die Vesikel in die *cis*-Kammer des Messaufbaus (vgl. Material und Methoden 2.13.) direkt unter den Lipidbilayer gegeben, um eine Membranfusion zwischen den Vesikeln und dem Lipidbilayer zu induzieren. Parallel dazu wurden die elektrischen Leitfähigkeitsänderungen des Lipidbilayers in Abhängigkeit von den verschiedenen α -Synucleinproben bzw. Kontrollproben aufgezeichnet. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Leitfähigkeit des Lipidbilayers nicht durch die verschiedenen Puffer allein (Ethanol, BSA, Fe^{3+} , NaPi) verändert wurde. α -Synuclein allein und die Kombination mit dem Aggregationsinduktor Ethanol, der wie beschrieben, auf Einzelmolekülebene zur Bildung von Intermediat I Oligomeren führte, hatten ebenfalls keinen Einfluss auf die Lipidmembranleitfähigkeit. Dies deutete darauf hin, dass die Intermediat I Oligomere nicht in der Lage waren, die Permeabilität des Lipidbilayers zu beeinflussen bzw. porenähnliche Strukturen in der Lipidmembran zu bilden. Im Gegensatz dazu führten Intermediat II Oligomere, erzeugt durch den synergistischen Effekt von Ethanol und Fe^{3+} , zu einem reproduzierbaren Effekt hinsichtlich einer erhöhten Membranleitfähigkeit (Tab. 3.5., Abb. 3.10.). Eine Steigerung der

Permeabilität bzw. Insertion von Membranporen wurde in den durchgeführten Versuchen reproduzierbar mit einer Erfolgsrate von 12-15 % beobachtet (Tab. 3.5.).

Tab. 3.5. Porenbildung durch α -Synucleinaggregate. Aggregationsansätze wurden wie dargestellt für 3 h in Gegenwart von präformierten Liposomen inkubiert. Danach wurden 1 μ l Aliquots des Reaktionsansatzes in die *cis*-Kammer direkt unterhalb der Bilayermembran appliziert, um eine Membranfusion zu erreichen. N stellt die Gesamtzahl der durchgeführten Applikationen dar. Die Veränderungen der elektrischen Leitfähigkeit an der Bilayermembran wurden aufgezeichnet. Eine Porenbildung wurde reproduzierbar mit einer Erfolgsrate von 12-15 % nur in den Reaktionsansätzen von α -Synuclein mit 20 % Ethanol/20 μ M FeCl₃ beobachtet. Dies zeigte sich für markiertes und unmarkiertes α -Synuclein. (Zusammenarbeit mit A. Wirth und R. Wagner Ionovation GmbH Osnabrück)

α -Synuclein	α -Synuclein - Alexa 488	Ethanol	20 μ M FeCl ₃	BSA	Fusionsrate [%]	N
-	-	-	-	-	0	42
+	-	-	-	-	0	42
-	+	-	-	-	0	42
-	-	bis 40%	-	-	0	42
-	-	-	+	-	0	42
-	-	-	-	+	0	42
+	-	20%	-	-	0	42
+	-	20%	+	-	15	162
-	+	20%	+	-	12	84
+	-	20%	+	+	0	42

Eine detaillierte Analyse der Leitwertverteilung in den verschiedenen Experimenten deutete dabei an, dass es sich hier nicht um eine diffuse Permeabilitätssteigerung handelte, sondern um stufenweise Leitwertänderungen durch definierte Poreneinheiten. Die kleinste Poreneinheit entsprach hierbei einer Leitfähigkeit von 50 pS unter symmetrischen Kammerbedingungen mit 10 mM Mops-Tris 250 mM KCl pH 7,0 (Abb. 3.10. B). Zum Vergleich ist für Gramicidinporen in 500 mM KCl ein Leitwert von 60 pS beschrieben worden [165], was unter den hier verwendeten Bedingungen einem Leitwert von etwa 30 pS entspräche. Keine der beobachteten Poren unseres Ansatzes zeigte ein ausgeprägtes Schaltverhalten, wie es für Ionenkanäle oder Proteintransporter üblich wäre. Die Poreneinheiten waren permanent geöffnet und besaßen ein gemessenes Umkehrpotential von $V_{rev} = -21 \pm 2$ mV (Abb. 3.10. A). Unter Anwendung der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung entsprachen diese Ergebnisse einer Ionenselektivität von $P_{Cl^-}/P_{K^+} \approx 2,75$. Der bekannte Ca²⁺-Kanalblocker Cobalt zeigte keinen Effekt auf die erhöhte Membranleitfähigkeit sowie keine geänderten Kanaleigenschaften, wenn eine fusionierte Poreneinheit aus unmarkiertem α -Synuclein mit einer Cobalt-Lösung perfundiert wurde. Bemerkenswert in den durchgeführten

Experimenten war die Tatsache, dass markiertes und unmarkiertes α -Synuclein gleiche Ergebnisse lieferten.

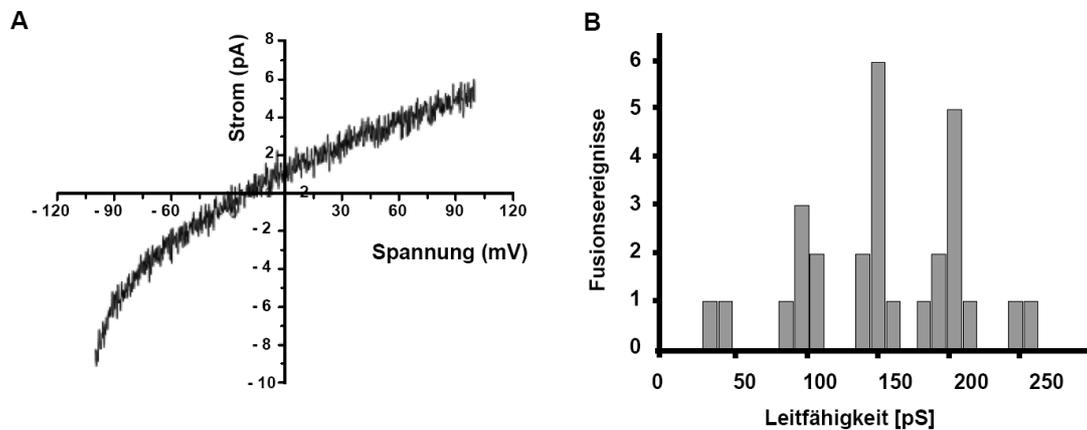


Abb. 3.10. Elektrophysiologische Analyse von α -Synucleinoligomeren in einem planaren Lipidbilayersystem bezüglich ihrer porenbildenden Eigenschaft.

A) Die typische Strom-Spannungskurve zeigt ein Umkehrpotential bei ca. -21 mV. B) Die Verteilung der Leitfähigkeiten, bestimmt aus verschiedenen Fusionsexperimenten, deutet auf die Existenz einer kleinsten Poreneinheit mit einer Leitfähigkeit von ca. 50 pS (in 250 mM KCl) hin.

3.9.2. Inhibition der Intermediat II bedingten Porenbildung

Übereinstimmend mit dem in der konfokalen Einzelmolekülspektroskopie beobachteten inhibitorischen Effekts des bovinen Serumalbumins (BSA) auf die Oligomerisierung von α -Synuclein, konnte die Porenbildung auch im Lipidbilayersystem durch die Gegenwart von BSA blockiert werden (Tab. 3.5.). Um zu untermauern, dass die Porenbildung von α -Synuclein abhängig ist, wurde dem Inkubationsansatz ein α -Synuclein-spezifischer Antikörper (Asy 1, Poul Henning Jensen, Universität von Aarhus, Dänemark) bzw. zur Kontrolle ein anti-A β -Antikörper (6E10, AG Kostka, Boehringer-Ingelheim, Biberach, Deutschland) zugesetzt. Wie erwartet, vermochte nur der anti- α -Synuclein-Antikörper die Porenbildung zu verhindern (Tab. 3.6.). Um zu untersuchen, ob oligomere Aggregatspezies für die Membranporenbildung verantwortlich waren, wurde der kürzlich als oligomerspezifisch beschriebene Antikörper A11 (Charles G. Glabe, Universität von Kalifornien, Irvine, USA, [94]) dem Inkubationsansatz zugefügt. Auch dieser oligomerspezifische Antikörper war in der Lage, die Porenbildung zu verhindern. Außerdem reduzierte der in die *cis*-Kammer gegebene A11 nach bereits stattgefundenener Integration von Membranporen in den Lipidbilayer in einem Experiment die Leitfähigkeit um ca. 30 %.

Tab. 3.6. Inhibierung der α -Synuclein-abhängigen Porenbildung durch den oligomerspezifischen Antikörper A11 und den anti- α -Synuclein Antikörper ASY 1 (2 μ g/ml). Experimente wurden analog zu Tab. 1 durchgeführt. Die Aggregation wurde durch 20 % Ethanol mit 20 μ M FeCl₃ induziert.

	Fusionsrate [%]	N
α -Synuclein	14	42
α -Synuclein + A11	0	42
α -Synuclein -Alexa488 + A11	0	42
α -Synuclein + asy1	0	42
α -Synuclein + 6E10	12	42

3.10. Intermediat I und II als Zielstruktur für eine kausale Therapie

Kayed *et al.* postulierten anhand ihrer Experimente, dass lösliche Oligomere bei unterschiedlichen neurodegenerativen Erkrankungen strukturelle Gemeinsamkeiten aufweisen und möglicherweise einen gleichartigen toxischen Effekt besitzen [94,95]. In meiner Arbeit konnte wie dargestellt ein stufenartiger, α -Synuclein-abhängiger Aggregationsprozess mit der Formation verschiedener oligomerer Strukturen (Intermediat I und II) etabliert und mit hoher Sensitivität auf Einzelmolekülebene nachgewiesen und charakterisiert werden. Die Tatsache, dass sich die Oligomerspezies in ihren Eigenschaften unterscheiden, insbesondere dass die Intermediat II eine potentiell toxische Eigenschaft aufweist, macht den stufenartigen Oligomerisierungsprozess zu einem attraktiven Modellsystem für das molekulare Screening auf potentiell antiaggregative Wirksubstanzen. Hierbei wäre vor allem die Blockade der Intermediat I Spezies als pharmakologische Zielstruktur interessant, um dadurch die Formation von toxischen Oligomerspezies bereits in einem frühen Stadium zu unterbinden.

3.10.1. Einsatz von DMSO als Aggregationsinduktor

Im Hinblick auf den Einsatz des beschriebenen zweistufigen Aggregationsansatzes im Rahmen eines pharmakologischen Substanzenscreenings wurde auch das organische Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) anstelle von Ethanol getestet. Hintergrund ist, dass chemischen Verbindungen für die Präparation von Stammlösungen im Rahmen von pharmakologischen Studien in der Regel in 100 % DMSO aufgenommen werden. Um die in der Regel für das Screening verwendete Zielkonzentration von 10 μ M Wirksubstanz zu erreichen, wäre im Aggregationsansatz somit trotz mehrerer Verdünnungsstufen noch immer DMSO in geringer Menge (ca. 1 %) vorhanden. Da ich ein Gemisch von Ethanol und DMSO

wegen eines sich potentiell überlappenden Effekts nicht für vorteilhaft hielt, wurde zunächst DMSO auf Effekte im Aggregationsansatz getestet. Das Ziel war es, herauszufinden, ob auch DMSO die Oligomerisierung im konfokalen Ansatz induzieren kann und in Kombination mit FeCl_3 einen ähnlichen synergistischen Effekt wie Ethanol zeigt. Interessanterweise ließ sich bereits in Gegenwart von 1 % DMSO ein zweistufiger eisenabhängiger Aggregationsprozess hinsichtlich der Bildung von kleinen (Intermediat I) und großen (Intermediat II) Oligomeren feststellen (Abb. 3.11. A). Vorteilhafterweise war der Effekt bei einer Konzentration von 1 % DMSO im Aggregationsansatz zu beobachten, was der typischen Endkonzentration an DMSO innerhalb eines Substanzenscreens entspricht. Ferner förderte DMSO analog zu Ethanol die Amyloidformation in ThT-Kontrollexperimenten (Abb. 3.11. B). Diese Erkenntnisse waren somit für das geplante molekulare Screening von großem Vorteil.

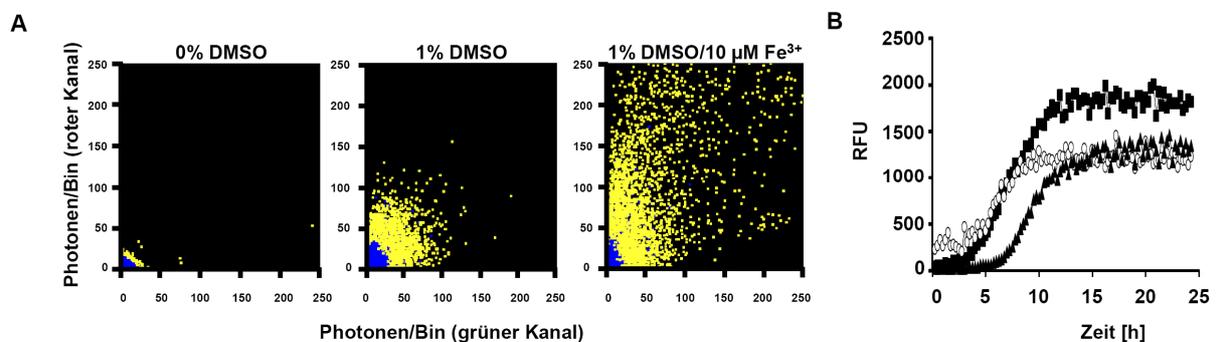


Abb. 3.11. Verwendung von DMSO anstelle von Ethanol als Aggregationsinduktor.

A) Alexa488- und Alexa647-markiertes α -Synuclein wurde in 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,0 in Gegenwart von 0 % DMSO, 1 % DMSO und 1 % DMSO/10 $\mu\text{M FeCl}_3$ inkubiert. Dargestellt sind die 2D-Intensitätsverteilungshistogramme, aus gescannten Messungen nach 3 h Inkubation. Die abgestuften Ergebnisse mit DMSO sind hierbei vergleichbar mit dem ethanolabhängigen Aggregationsansatz (vgl. Abb. 3.5.-3.7.). B) Thioflavin T Messungen. Die Aggregation von unmarkiertem α -Synuclein (1 mg/ml) wurde in Gegenwart von 0 % DMSO (\blacktriangle), 1 % DMSO (\circ) und 3 % DMSO (\blacksquare) bei 37°C durchgeführt. Sowohl 1 % DMSO als auch 3 % DMSO beschleunigten die Amyloidbildung. Dargestellt ist der Mittelwert von Dreifachmessungen.

An dieser Stelle sei ein Verweis auf weiterführende Experimente gestattet: Auch im DMSO/ Fe^{3+} -abhängigen Aggregationsansatz unterschieden sich die Oligomere hinsichtlich ihrer pathophysiologischen Relevanz, was in enger Kollaboration mit Frau Sandra Paluch (Promotionsarbeit bei Prof. Jochen Herms, ZNP, LMU München) und mit Herrn Mario Caruana (Promotionsarbeit bei Dr. Neville Vassallo, Universität Malta, Msida, Malta) an autaptischen Neuronenzellkulturen und mit farbstoffgefüllten Liposomen untersucht wurde. Auch dort ließ sich eine „toxische“ Eigenschaft nur mit den DMSO/ Fe^{3+} -induzierten Oligomeren nicht jedoch mit durch DMSO allein induzierten Oligomere nachweisen. Einerseits führte nur die Zugabe von diesen DMSO/ Fe^{3+} -induzierten Oligomeren auf

autaptische Neuronenzellkulturen zu einer erhöhten Konzentration an intrazellulärem Ca^{2+} , andererseits waren diese Oligomere in der Lage, mit dem Farbstoff Oregon-Green-BAPTA gefüllte Liposomen zu permeabilisieren, was in einer Ca^{2+} -abhängigen Fluoreszenzreaktion detektiert werden konnte (vgl. Diskussion 4.2.).

3.10.2. SDS-Resistenz von Intermediat II

Um zu evaluieren, inwieweit die Intermediat I und II Aggregate geeignete Zielstrukturen für ein Medikamentenscreening darstellen, wurden die Eigenschaften der beiden oligomeren Aggregatspezies, zusätzlich zu den beschriebenen elektro- und pathophysiologischen Merkmalen, mit charakteristischen Eigenschaften von *in vivo* nachgewiesenen α -Synucleinaggregaten verglichen. In der Literatur wurden bereits mehrfach krankheitsassoziierte α -Synucleinaggregate im menschlichen Gewebe bzw. im transgenen Mausmodell als SDS-resistent dargestellt [86,114]. SDS ist ein starkes, ionisches Detergens und wird in der Forschung bei Aggregationsstudien anderer amyloidogener Proteine, wie z.B. dem Prionprotein oder dem Tau-Protein, oft verwendet [7,54,115]. Daher stellte sich die Frage, ob die generierten Intermediat I oder II Oligomere hinsichtlich ihrer Resistenz gegenüber SDS Parallelen gegenüber *in vivo* detektierten Aggregaten aufweisen würden. Analog zu den unter Punkt 3.3. dargestellten Ergebnissen vermochte der Einsatz von 0,2 % SDS die *de novo* Bildung von Intermediat I und II effizient zu blockieren (Abb. 3.12.). Im Gegensatz dazu waren die Intermediat II Oligomere jedoch gegenüber einer nachträglichen Zugabe von SDS bzw. NP-40 resistent und konnten nicht wieder aufgelöst werden. Die Intermediat I Oligomere zerfielen dagegen wieder komplett durch den Zusatz von SDS bzw. NP-40 (Abb. 3.12.). Diese SDS-Resistenz der Intermediat II Oligomere zeigte sich beim Einsatz beider Aggregationsinduktoren (Ethanol und DMSO) in Verbindung mit Fe^{3+} . Das Ergebnis lieferte somit den zusätzlichen Hinweis darauf, dass die Intermediat II Oligomere strukturelle Ähnlichkeiten mit krankheitsassoziierten *in vivo* relevanten α -Synucleinaggregaten teilen. Außerdem unterstützen diese Daten die Hypothese, dass eiseninduzierte Intermediat II Oligomere in einem mehrstufigen Reaktionsweg aus detergenslabilen Intermediat I Oligomeren entstehen.

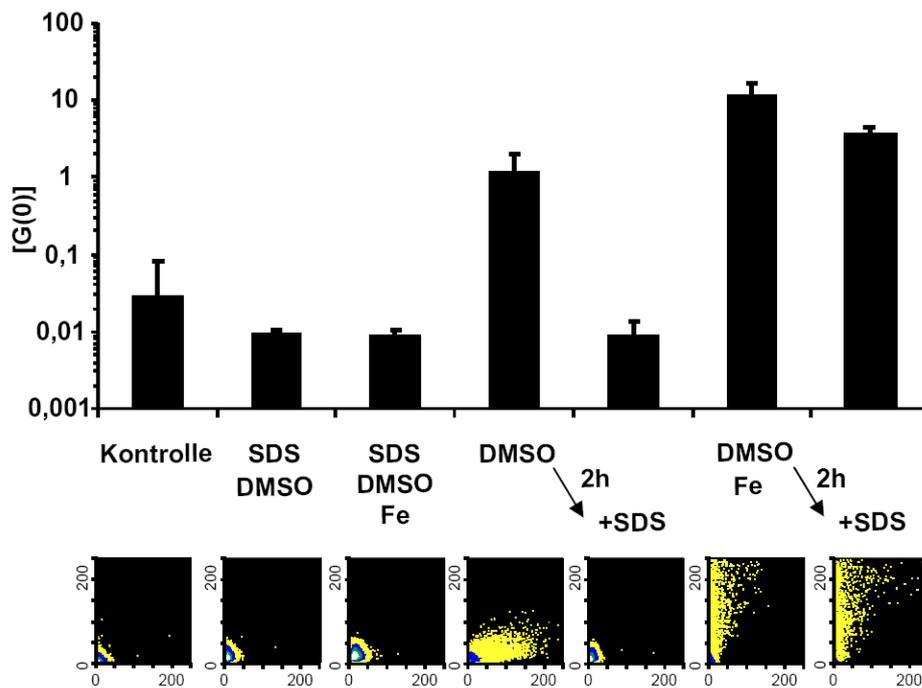


Abb. 3.12. α -Synuclein Intermediat II Oligomere sind resistent gegenüber SDS. Die Aggregatformation wurde in einem Gemisch von α -Synuclein-Alexa488 und α -Synuclein-Alexa647 in 50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,0 verfolgt. Dargestellt ist der Mittelwert und Standardfehler der Kreuzkorrelationsamplitude $[G(0)]$ aus Vierfachbestimmungen in Verbindung mit repräsentativen 2D-Intensitätsverteilungshistogrammen aus demselben Experiment. In Gegenwart von 1 % DMSO ist die Bildung kleiner Intermediat I Oligomere zu erkennen. Die Kombination 1 % DMSO und 10 μ M FeCl_3 induziert dagegen größere Intermediat II Oligomere. Die vorherige Zugabe von 0,2 % SDS zum Reaktionsansatz vermag die Formation von Intermediat I und II zu blockieren. Dagegen führt nach Inkubation von 2 h eine nachträgliche Zugabe von 0,2 % SDS nur zu einer Auflösung der Intermediat I Aggregate. Die Intermediat II Oligomere sind dagegen SDS-resistent.

3.10.3. Vergleich von Fe^{3+} und Fe^{2+} und der Einsatz von Desferroxamin

Interessanterweise findet sich in Studien an postmortalem Gewebe von Parkinsonpatienten neben einem erhöhten Eisengehalt [32,64,142] im zentralnervösen Gewebe auch ein zu Gunsten von Fe^{3+} verschobenes Verhältnis zwischen Fe^{3+} und Fe^{2+} [163]. Um zu ermitteln, ob der beobachtete Effekt von Fe^{3+} durch in der Literatur oft postulierte Redoxeffekte bedingt sein könnte, oder ob der Effekt durch eine direkte Interaktion dreiwertiger Ionen mit dem α -Synuclein vonstatten geht, wurden in einigen Experimenten neben FeCl_3 frisch gelöstes FeCl_2 verwendet. Dadurch ließ sich eruieren, ob die aggregationsfördernde Wirkung vom oxidativen Zustand des Eisenions abhängt. Im Gegensatz zu Fe^{3+} (Eisen(III)-Chlorid) war Fe^{2+} (Eisen(II)-Chlorid) nicht in der Lage, die Bildung von Intermediat II zu induzieren (Abb. 3.13. A). Im Einklang mit diesem Ergebnis konnte auch die Gegenwart von Natriumascorbat

(Vitamin C) eindrucksvoll die Fe^{3+} -abhängige Bildung von Intermediat II Oligomeren verhindern (Abb. 3.13. B). Dieser Effekt korreliert mit der Reduktion von Eisen(III)-Chlorid zu Eisen(II)-Chlorid [100]. Bemerkenswerterweise hatte der Einsatz von Natriumascorbat nahezu keinen Effekt auf die durch Al^{3+} -induzierten Intermediat II Oligomere. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Bildung von Intermediat II Oligomeren abhängig ist von der Verfügbarkeit dreiwertiger Metallionen und nicht primär auf eine Oxidation des α -Synucleins durch Eisen(III)-Chlorid sowie einer dadurch induzierten Aggregation zurückzuführen ist. Hinsichtlich therapiefokussierter Untersuchungen zeigen einige Studien, dass Ionenchelatoren, wie z.B. Desferroxamin, eine neuroprotektive Wirkung in Tiermodellen von Morbus Parkinson besitzen [143,174,205,210]. Daher wurde auch der Effekt des Fe^{3+} -Chelators Desferroxamin im vorgestellten α -Synucleinaggregationsansatz getestet. Der Einsatz von Desferroxamin konnte die Bildung von Intermediat II Oligomeren effizient blockieren (Abb. 3.13. C).

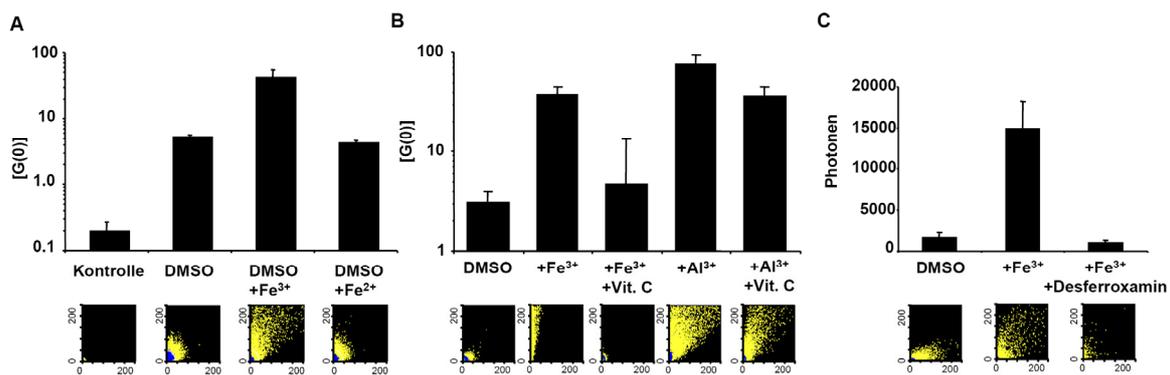


Abb. 3.13. Spezifischer Effekt von Fe^{3+} -Ionen.

Die Bildung von Intermediat II α -Synucleinoligomeren wird nur durch Fe^{3+} nicht jedoch durch Fe^{2+} induziert. Experimente wurden analog zu denen in Abb. 3.12. durchgeführt. Natriumascorbat (Vit. C, 10 mM) und Desferroxamin (10 mM) wurden vor α -Synuclein zum Reaktionsansatz gegeben. A) Unter Kontrollbedingungen konnte keine Aggregation beobachtet werden. Die Zugabe von 1 % DMSO bzw. 1 % DMSO/10 μM FeCl_3 induzierte die Bildung von Intermediat I bzw. Intermediat II Oligomeren. Im Gegensatz dazu beeinflusst die Zugabe von FeCl_2 nicht die Aggregation. B) Die Reduktion von Fe^{3+} durch die Anwesenheit von 10 mM Vit. C konnte den Effekt von Eisen auf die Aggregation verhindern. Interessanterweise hat Vit. C nur einen geringen Einfluss auf die Al^{3+} -induzierte Aggregation, vereinbar mit der Tatsache, dass Aluminium durch Vit. C nicht in einen zweiwertigen Zustand reduziert werden kann. C) Die Vorinkubation mit dem Fe^{3+} -Chelator Desferroxamin (10 mM) blockiert ebenfalls den FeCl_3 -abhängigen α -Synucleinaggregationsprozess. A) und B) stellen den Mittelwert mit Standardfehler der Kreuzkorrelationsamplitude $[G(0)]$ aus Vierfachbestimmungen dar. Zudem sind repräsentative 2-D Intensitätshistogramme aufgeführt. In C) wurde die Aggregation aus Vierfachbestimmungen mit der SIFT-Analyse quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler der aggregatspezifischen Photonen.

3.10.4. Wechselwirkung der Intermediat I und II Oligomere mit Lipidvesikeln

Wie bereits in der Einleitung (vgl. 1.4.3.) erwähnt, wird hinsichtlich der physiologischen Funktion des monomeren α -Synucleins u.a. eine Stabilisierung von Membranen und die Regulierung des Vesikelpools diskutiert [14,191]. Im Zusammenhang mit potentiell pathophysiologischen, neurotoxischen Mechanismen beim Morbus Parkinson wird dagegen eine Zerstörung bzw. Schädigung von synaptischen Vesikeln oder Zellorganellen durch α -Synuclein bzw. α -Synucleinaggregate erwogen [45,57,107]. Um die Interaktion von Proteinen mit Lipidmembranen verschiedener Lipidzusammensetzungen gezielt zu untersuchen, wurden in den vergangenen Jahren synthetische, unilamellare Vesikel als *in vitro* Modellsysteme verwendet. Diese Vesikel, die durch Sonifikation oder durch Extruderverfahren leicht hergestellt werden können, boten für meine Arbeit eine ideale Zielstruktur, die Wechselwirkung von monomerem α -Synuclein im Vergleich zu den Intermediat I und II Oligomeren zu untersuchen und dadurch funktionelle Unterschiede zu charakterisieren. Kürzlich konnte von Kamp *et al.* und Nuscher *et al.* [87,141] gezeigt werden, dass monomeres α -Synuclein je nach Lipidzusammensetzung eine höhere Affinität für kleine gestresste, sich im sog. Gel-Zustand (engl. „gel-state“) befindliche, unilamellare, zwitterionische Vesikel besitzt als für diejenigen Vesikel, die eine defektfreie, fluide Oberfläche besitzen (engl. „liquid-crystalline-state“). Der entsprechende Zustand kleiner Lipidvesikel hängt dabei von zwei Faktoren ab: Erstens der Anwesenheit von ungesättigten Bindungen im Fettsäureschwanz und zweitens der Umgebungstemperatur bei der die Vesikel vorliegen. Unterhalb der Phasenübergangstemperatur (T_m) der Lipide, die z.B. für DPPC (Dipalmitoyl-Oleyl-Phosphatidylcholin, d.h. zwei gesättigte Fettsäuren) bei ca. 37 °C und für POPC (Palmitoyl-Oleyl-Phosphatidylcholin, d.h. eine ungesättigte, eine gesättigte Fettsäure) bei ca. - 5 °C liegt, weisen die Phospholipidvesikel eine fest geordnete, solide, mit vielen Defekten versehene Oberflächenstruktur auf („gel-state“). Dieser Zustand ist vergleichbar mit dem Bild von zusammenprallenden Eisschollen. Oberhalb der T_m dagegen zeigen die Vesikel eine ungeordnete und somit weiche, fluide Oberfläche in einem sog. flüssig-kristallinen Zustand („liquid-crystalline-state“). Dieser weist keine Membrandefekte auf. Die auffällige Präferenz des α -Synucleinmonomers für kleine, stark gekrümmte Phospholipidvesikel (SUV, engl. „small unilamellar vesicle“) mit einem erhöhten Oberflächen-Volumenverhältnis bzw. die Präferenz für Phospholipidvesikel im „gel-state“ verdeutlichte in den letzten Jahren, dass α -Synucleinmonomere zur Interaktion mit Lipid-Wasser-Grenzflächen und zur Abdeckung von Membrandefekten sowie zur Modulation der Membranintegrität fähig sind [14,87,141].

Die Interaktion von verschiedenen Vesikeltypen mit α -Synucleinaggregaten ist aber bis dato noch unzureichend geklärt. Aus diesem Grund wurden kleine unilamellare Phospholipidvesikel (POPC und DPPC) mit einem Durchmesser von ≈ 30 nm (DPPC) bzw. 30-50 nm (POPC) für meine *in vitro* Bindungsstudien im Aggregationsansatz verwendet. Die Vesikel wurden mit BODIPY-fluoreszenzfarbstoff-markierten Fettsäuren versetzt, sodass sie durch den 488 nm Laser des Insight Readers angeregt und im grünen Kanal detektiert werden konnten. Die Inkubation der „grünen“ POPC-Vesikel (10 μ M Lipidkonzentration) im „liquid-crystalline-state“, welche bekannterweise keine α -Synucleinmonomere binden, mit Alexa647-markiertem α -Synuclein führte unter Pufferkontrollbedingungen (50 mM Tris-HCl pH 7,0) und auch in Gegenwart von 10 μ M FeCl₃ zu keiner Ko-Aggregation (Abb. 3.14. A). Die Anwesenheit von 1 % DMSO im Reaktionsansatz induzierte zwar Alexa647-markierte Intermediat I Oligomere, aber auch diese zeigten keine Assoziation mit den markierten POPC-Vesikel. Jedoch war unter den Aggregationsbedingungen, die Intermediat II Oligomere entstehen ließen, eine deutliche Ko-Aggregation und die Bildung von zweifarbig markierten, hochintensiven Partikeln zu verzeichnen. Dies wurde als Bindung der Intermediat II Oligomere an die POPC-Vesikel gedeutet, zumal nahezu keine freien, rein „roten“ Intermediat II Oligomere mehr detektierbar waren. Dies war ein Hinweis darauf, dass alle Intermediat II Oligomere an die POPC-Vesikel gebunden waren (Abb. 3.14. A). Interessanterweise zeigte der Einsatz von DPPC-Vesikeln, d.h. Vesikeln im „gel-state“, im Aggregationsansatz unter allen Bedingungen eine Interaktion zwischen Alexa-647-markiertem α -Synuclein und den DPPC-Vesikeln. Unter der Annahme, dass monomeres α -Synuclein eine äußerst hohe Präferenz besitzt, sich in die „gel-state“ Membrandefekte einzulagern [87], wurde diese Ko-Aggregation in allen Stufen als mögliche Bindung der markierten α -Synucleinmonomere an die DPPC-Vesikel gedeutet.

Um diese Hypothese zu untermauern, wurde die FRET-Methode (engl. „fluorescence resonance energy transfer“, Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer) eingesetzt. Dabei wurden die gleichen Aggregationsansätze, wie oben beschrieben, nicht mit beiden Lasern (488 nm und 647nm) des Insight Readers angeregt, sondern es wurde nur das 488 nm Lasermodul zur Anregung verwendet. Im Falle einer intermolekular engen räumlichen Beziehung zwischen farbig unterschiedlich markierten Partikeln (grün = kürzere Wellenlänge, höhere Energie; und rot = längere Wellenlänge, geringere Energie) erfolgt nach Anregung des energetisch höher liegenden Reaktionspartners durch den grünen Laser eine Energieübertragung auf den anderen, energetisch niedrigeren Reaktionspartner. Dieser

Energietransfer bedingt durch die enge räumliche Beziehung liefert somit ein Signal im roten Detektionskanal. Würden die zu untersuchenden Interaktionspartner keine enge Bindung eingehen, liefert dies auch kein FRET-Signal. Die FRET-Untersuchungen der Aggregationsansätze ergaben für die Ko-Aggregation von „grünen“ DPPC-Vesikeln mit Alexa-647-markierten α -Synucleinmonomeren ein deutliches FRET-Signal (Abb. 3.14. B). Dies kann als Indiz für die enge Einlagerung von α -Synucleinmonomeren in die Membran angesehen werden. Im Gegensatz dazu zeigten die POPC-Vesikel unter keiner der untersuchten Bedingungen einen nennenswerten positiven FRET-Effekt. Das Fehlen des FRET-Effekts zwischen POPC-Vesikeln und Alexa-647-markiertem α -Synuclein in Gegenwart von 1 % DMSO und 10 μ M FeCl₃ stärkt die Hypothese, dass Intermediat II Oligomere an die Lipidvesikel binden und nicht α -Synucleinmonomere, da die Anlagerung der Intermediate II Oligomere an die POPC-Vesikel vermutlich bis auf den direkten Kontaktpunkt zwischen Vesikel und Aggregat eine zu große räumliche Distanz für einen FRET-Effekt bedingt.

Die Interpretation, dass sich in Gegenwart von 1 % DMSO und 10 μ M FeCl₃ Intermediat II Oligomere an POPC-Vesikel binden, wohingegen die DPPC-Vesikel infolge Bindung der Monomere an Membrandefekte die Aggregation von α -Synuclein verhindern, wird auch durch die nachträgliche Zugabe von SDS mit der Endkonzentration von 0,2 % im Aggregationsansatz gestützt. Durch das Detergens werden die Vesikel aufgelöst, wohingegen die Intermediat II Oligomere als SDS-resistente Partikel bestehen bleiben. Die nachträgliche Zugabe von SDS löste in den durchgeführten Experimenten die POPC-Vesikel auf, die Intermediat II Oligomere blieben dagegen als hochintense Signalpunkte im roten Detektionskanal der SIFT-Messung erhalten. Im Gegensatz dazu bewirkte die SDS Zugabe in den Experimenten mit DPPC-Vesikeln deren Auflösung und das Fehlen hochintensiver Signalpunkte im roten Detektionskanal. Dies ist vereinbar mit der Bindung von α -Synucleinmonomeren an die DPPC-Vesikel.

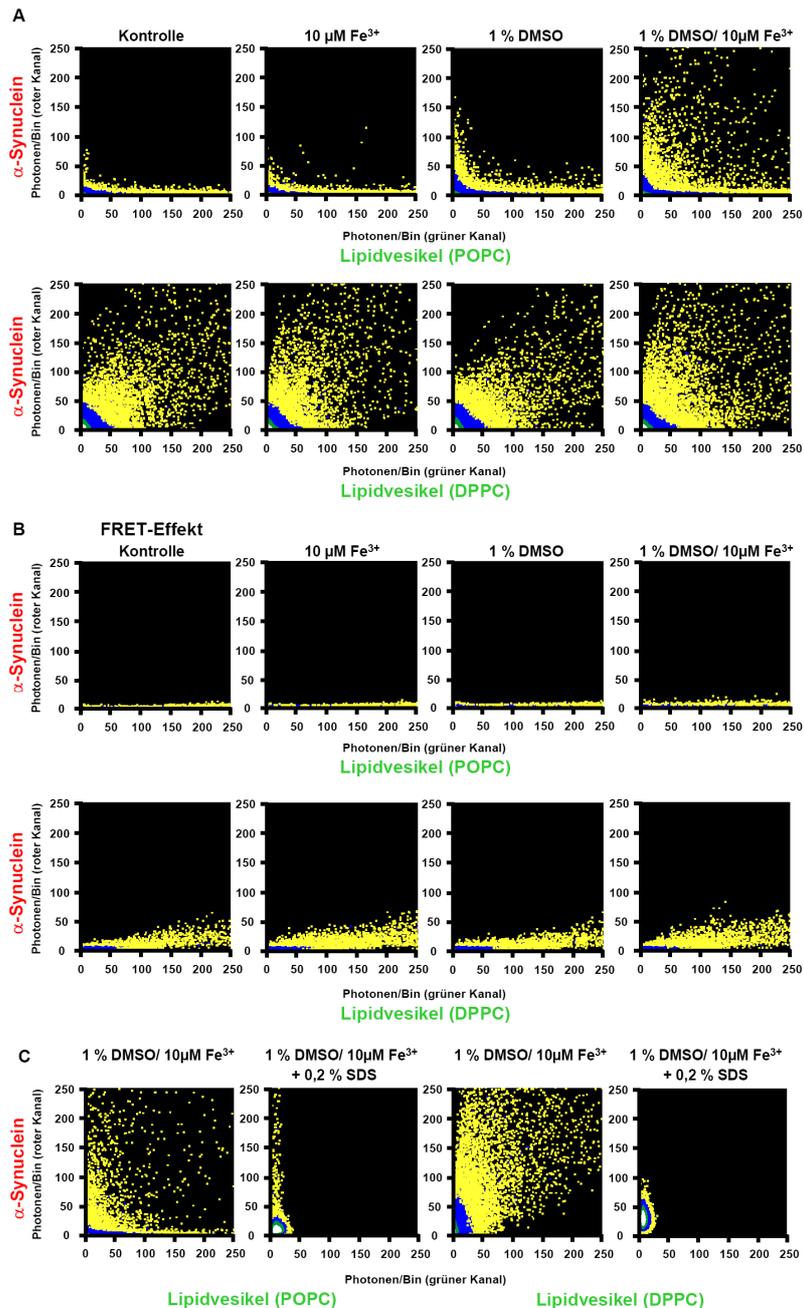


Abb. 3.14. Interaktion von α -Synuclein mit verschiedenen kleinen, unilamellaren Lipidvesikeln. A) Die Aggregation von Alexa-647-markiertem α -Synuclein (10 nM) wurde in 50 mM Tris-HCl pH 7,0 unter verschiedenen Bedingungen sowie in Gegenwart von POPC- („liquid-crystalline-state“) oder DPPC- („gel-state“) Lipidvesikeln verfolgt. Während die POPC-Vesikel nur die Intermediat II Oligomere binden, lagern sich an die DPPC-Vesikel die Alexa-647-markierten α -Synucleinmonomere an. B) FRET-Analyse der α -Synuclein-Vesikel-Interaktion. Die alleinige Anregung durch das 488 nm Lasermodul führt nur im Reaktionsansatz mit den DPPC-Vesikeln zu einem FRET-Signal im roten Detektionskanal, was einer Einlagerung von α -Synucleinmonomeren in die Membran der Vesikel entspricht. Die Bindung der Intermediat II Oligomere an die POPC-Vesikel liefert kein FRET-Signal. C) Die nachträgliche Zugabe von 0,2 % SDS löst die Lipidvesikel in ihrer Struktur auf. Während SDS-resistente Aggregate im POPC-Vesikelansatz bestehen bleiben, finden sich im DPPC-Vesikelansatz keine SDS-resistenten Aggregate. Dargestellt sind die 2D-Intensitätsverteilungshistogramme aus gescannten SIFT-Messungen, die über einen Zeitraum von 3-4 Stunden verfolgt wurden.

3.11. Testung von potentiellen Aggregationsinhibitoren

Ein großer Vorteil der verwendeten, einzelmolekülbasierten Fluoreszenzmethoden (FCS, FIDA und SIFT) ist deren Eignung zur Verwendung innerhalb pharmakologischer Hochdurchsatzverfahren (engl. „high-throughput screening“). Damit ist es möglich, äußerst effizient potentielle Wirksubstanzen aus einer großen Substanzbibliothek zu fischen, die unter Umständen pathologische Aggregationsprozesse im Rahmen verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen beeinflussen können. Nach der Etablierung eines geeigneten Aggregationsansatzes, wie in dieser Arbeit erfolgt, liegt die Überlegenheit dieser Methoden darin, dass in geringen Probenvolumina und somit mit geringsten Substanzmengen zeiteffizient verschiedene Ansätze getestet und dadurch wirksame antiaggregative Substanzen *in vitro* entdeckt werden können. Bertsch *et al.* (2005) identifizierten am Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung der LMU München 2005 mit der SIFT-Methode aus einer Substanzbibliothek von 10000 Verbindungen erfolgreich mehrere Derivate der N'-Benzyliden-Benzohydrazid Substanzklasse (NBB), die sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in der Lage waren, die Prionproteinaggregation und die PolyQ-Aggregation zu inhibieren [12,169]. Vor diesem Hintergrund wurden acht ausgewählte NBB-Derivate, Baicalein und weitere Substanzen mit in der Literatur diskutierter anti-aggregativer Wirkung im von mir etablierten einzelmolekülbasierten α -Synucleinaggregationsansatz auf ihre potentiell inhibitorische Eigenschaft getestet. Baicalein, ein Flavonoid und Hauptkomponente der chinesischen Heilpflanze *Scutellaria baicalensis*, besitzt ein großes biologisches Wirkspektrum, einschließlich anti-allergischer, anti-karzinogener und anti-viraler Eigenschaften. Zudem wurde veröffentlicht, dass Baicalein corticale Neuronen im Tiermodell (Ratte) durch eine Inhibierung der Lipooxygenase vor dem toxischen Amyloid- β -Einfluss schützt und *in vitro* die Fibrillisierung von α -Synuclein blockiert, ja Fibrillen sogar wieder auflösen kann [111,212]. Als pharmakologische Zielstruktur im *de novo* Reaktionsansatz wurden die Intermediat I Oligomere mit dem Ziel analysiert, die pathologischen Aggregationsprozesse im frühen Stadium zu unterbinden und die toxischen eisenabhängigen Intermediat II Oligomere gar nicht erst entstehen zu lassen. Die Aggregation wurde dabei durch den Einsatz von 1 % DMSO induziert und in Gegenwart der verschiedenen Substanzen über 4 h im Insight Reader verfolgt. Für die Kontrolle diente ein Ansatz mit 1 % DMSO. Dabei ergab sich aus der SIFT- und der XCorr-Analyse, dass Baicalein in einer für pharmakologische Screeninguntersuchungen gängigen Konzentration von 10 μ M äußerst effizient die Aggregation und Bildung von Intermediat I α -Synucleinoligomeren blockierte. Auch zwei der getesteten NBB-

Substanzen blockierten die α -Synucleinoligomerisierung effektiv, zwei weitere NBBs hatten einen schwächeren anti-aggregativen Effekt (Abb. 3.15. A und B).

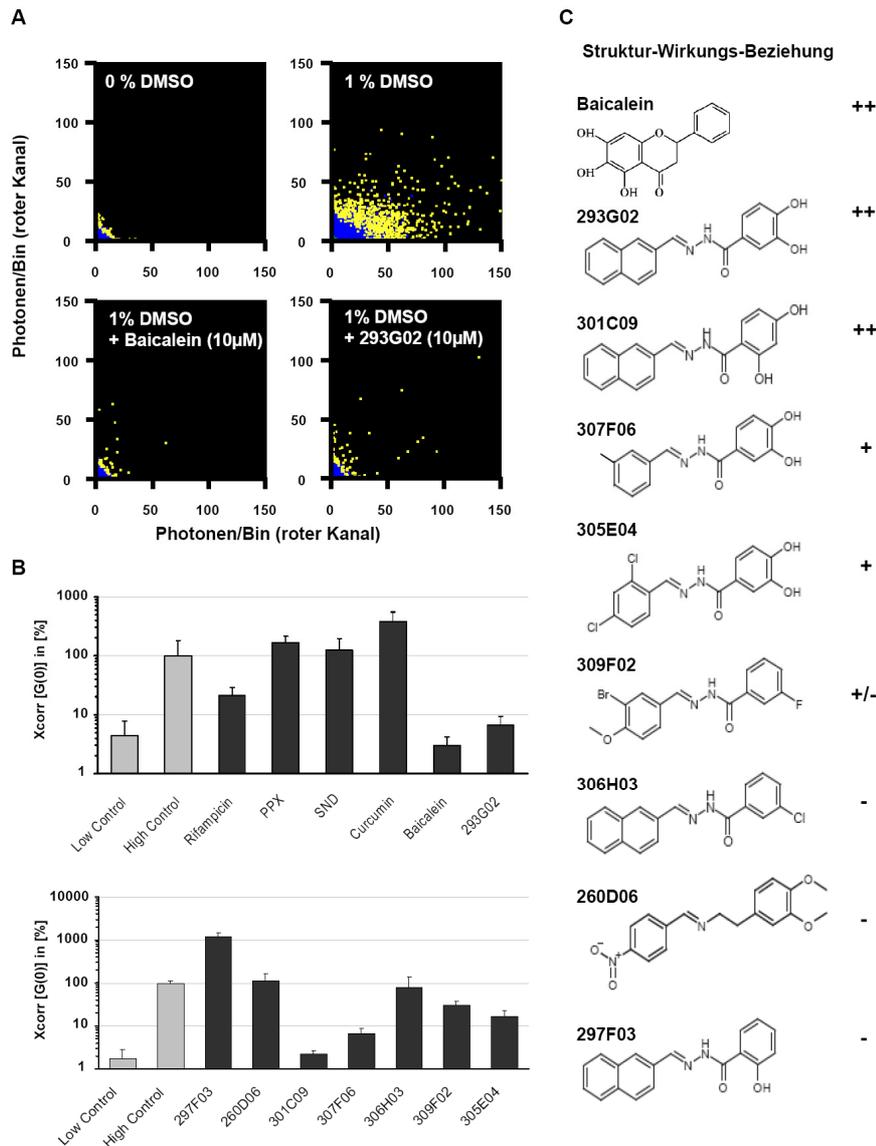


Abb. 3.15. N'-Benzyliden-Benzohydrazide (NBB) Derivate und Baicalein inhibieren die α -Synucleinaggregation. A) Die Aggregation von α -Synuclein-Alexa488 und -Alexa647 zu Intermediat I Oligomeren wurde durch 1 % DMSO induziert. Die NBB-Substanz 10293G02 und Baicalein (10 μ M) waren in der Lage, die Aggregation von α -Synuclein effektiv zu unterbinden. Dargestellt sind die 2D Intensitätsverteilungshistogramme aus gescannten Messungen nach 4 h Inkubation. B) Substanzenscreen im SIFT-Aggregationsansatz. Dargestellt sind die auf die Positivkontrolle (1 % DMSO) normierten Mittelwerte der Kreuzkorrelationen aus vierfachen Bestimmungen mit Standardabweichung. C) Acht NBB-Derivate und Baicalein wurden bei einer Konzentration von 10 μ M auf die Fähigkeit getestet, die Aggregation von α -Synuclein zu verhindern. Dabei korrelierte die Anwesenheit von zwei OH-Gruppen am Benzohydrazidring der NBBs mit der Aktivität.

Interessanterweise war die inhibitorische Eigenschaft der NBBs abhängig von der Anwesenheit zweier OH-Gruppen am Benzohydrazidring. Dies deutet auf eine klar definierte Struktur-Wirkungsbeziehung hin (Abb. 3.15. C). Neben Baicalein und den NBB wurden noch weitere in der Literatur beschriebene Wirkstoffe getestet. Dazu gehörten Rifampicin, das Parkinsontherapeutikum (-)-2-Amino-6-n-Propylamino-4,4,5,6,7-Tetrahydrobenzo-Thiazol (PPX) und sein Enantiomer (+)-2-Amino-6-n-Propylamino-4,4,5,6,7-Tetrahydrobenzo-Thiazol (SND919), sowie Curcumin, ein Stoff aus der Gelbwurzel [117,149]. Die Analyse dieser Substanzen im Aggregationsansatz lies nur bei Rifampicin einen schwach inhibitorischen Effekt erkennen, der jedoch wesentlich geringer als der des Baicaleins bzw. der bestwirksamsten NBB-Substanzen war. Die Messungen mit Curcumin waren durch dessen Eigenfluoreszenz überlagert. Auch (+)-2-Amino-6-n-Propylamino-4,4,5,6,7-Tetrahydrobenzo-Thiazol und (-)-2-Amino-6-n-Propylamino-4,4,5,6,7-Tetrahydrobenzo-Thiazol hatten keinen Einfluss auf den Oligomerisierungsprozess in der konfokalen Einzelmolekülspektroskopie (Abb. 3.15. B).

4. Diskussion

4.1. Rolle von Proteinaggregaten in der molekularen Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen

Pathologische Proteinaggregationsprozesse und die Bildung β -faltblattreicher, amyloider Proteinablagerungen sind die molekularen Schlüsselereignisse einer Vielzahl neurodegenerativer Krankheiten, einschließlich der Alzheimer Krankheit, der CAG-Tripletkrankheiten (PolyQ-Krankheiten), der Prionkrankheiten und des Morbus Parkinson [99]. Die Hypothese, dass Oligomere und nicht Amyloidfibrillen oder die großen, lichtmikroskopisch sichtbaren Einschlusskörperchen in Neuronen bzw. Gliazellen die eigentlich toxische Aggregatspezies darstellen [34,57,65,107,200], hat nicht nur Bedeutung für das Verständnis der pathophysiologischen Abläufe, sondern ist auch entscheidend für die Identifizierung potentieller therapeutischer Zielstrukturen [18,95]. Allerdings sind die molekularen Mechanismen und die Reaktionsbedingungen, die für die Entstehung krankheitsassoziierter toxischer Oligomere von Bedeutung sind, sowie deren biophysikalische und funktionelle Eigenschaften noch nicht hinreichend charakterisiert. Als mögliche toxische Wirkungsmechanismen der oligomeren Proteinaggregate wurden in der Vergangenheit die Bildung von Poren bzw. die Permeabilisierung von zellulären Lipidmembranen sowie die Schädigung von Zellorganellen diskutiert [65,95,107,196].

In diesem Zusammenhang postulierten Goldberg *et al.* als eine der ersten Forschungsgruppen ringförmige Protofibrillen als die toxische Spezies innerhalb des pathologischen Aggregationsprozesses bei Morbus Parkinson [61]. *In vitro* Aggregationsstudien, zusammen mit neurodegenerationsfokussierten *in vivo* Untersuchungen am Tiermodell und an humanem Gewebe, erhärteten zusätzlich die Hypothese, dass auch Metallionen in der Formation verschiedener Aggregatspezies eine wichtige Rolle spielen und den Verlauf des Morbus Parkinson entscheidend beeinflussen können [11,48,64,193]. Über den Effekt der Metallionen wird diskutiert, dass diese maßgeblich an der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und freien Radikalen beteiligt sind und sowohl durch oxidativen Stress als auch in Folge pathologischer Aggregationsprozesse zellulären Schaden anrichten [11,48,209]. Basierend auf dieser wissenschaftlichen Grundlage war es das Ziel dieser Arbeit, mit Hilfe der konfokalen Einzelmolekülspektroskopie zum Verständnis der molekularpathologischen Zusammenhänge hinsichtlich der α -Synucleinaggregation beim Morbus Parkinson beizutragen. In enger Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Dr. Marcus Kostka (CNS Research, Boehringer-Ingelheim, Biberach, Deutschland) wurde dabei auch der Aspekt

verfolgt, die Ergebnisse zur Etablierung eines pharmakologischen Hochdurchsatzverfahrens (engl. „high-throughput screening“) zu nutzen, um dadurch die Entdeckung kausal therapeutischer Wirksubstanzen für die Medikamentenentwicklung voranzubringen. Neben klassischen biochemischen Methoden wurde in dieser Arbeit zur Analyse der Aggregationsprozesse und der Oligomerbildung des α -Synucleins besonderes Augenmerk auf die Verwendung verschiedener, voneinander unabhängiger, einzelmolekülbasierter Techniken gelegt. Dabei konnten auf Einzelpartikelebene erstmalig durch die Kombination der konfokalen, fluoreszenzbasierten Einzelmolekülspektroskopie, der Rasterkraftmikroskopie (AFM) und der Einzelporenelektrophysiologie umfassend zwei verschiedene Oligomerspezies (Intermediat I und II) charakterisiert werden, die sich in einem abgestuften Prozess bilden können. Dabei vermochte nur eine der beiden Aggregatspezies, nämlich die SDS-resistenten Intermediat II Spezies, welche spezifisch durch die Anwesenheit von mikromolaren Fe^{3+} -Konzentrationen induziert werden konnte, ionendurchlässige Poren in planaren Lipid-Doppelschichtmembranen zu formen. Zudem war diese Spezies in der Lage, mit unilamellaren, flüssig-kristallinen POPC-Lipidvesikel, die natürlicherweise keine Bindungstendenz für monomeres α -Synuclein besitzen, zu interagieren (Abb. 4.1.). In einer Pilotstudie wurden diese Oligomerspezies als pharmakologische Zielstruktur ausgewählt und im zellfreien FCS/SIFT-Aggregationsansatz verschiedene chemische Substanzen auf ihre antiaggregative Eigenschaft getestet.

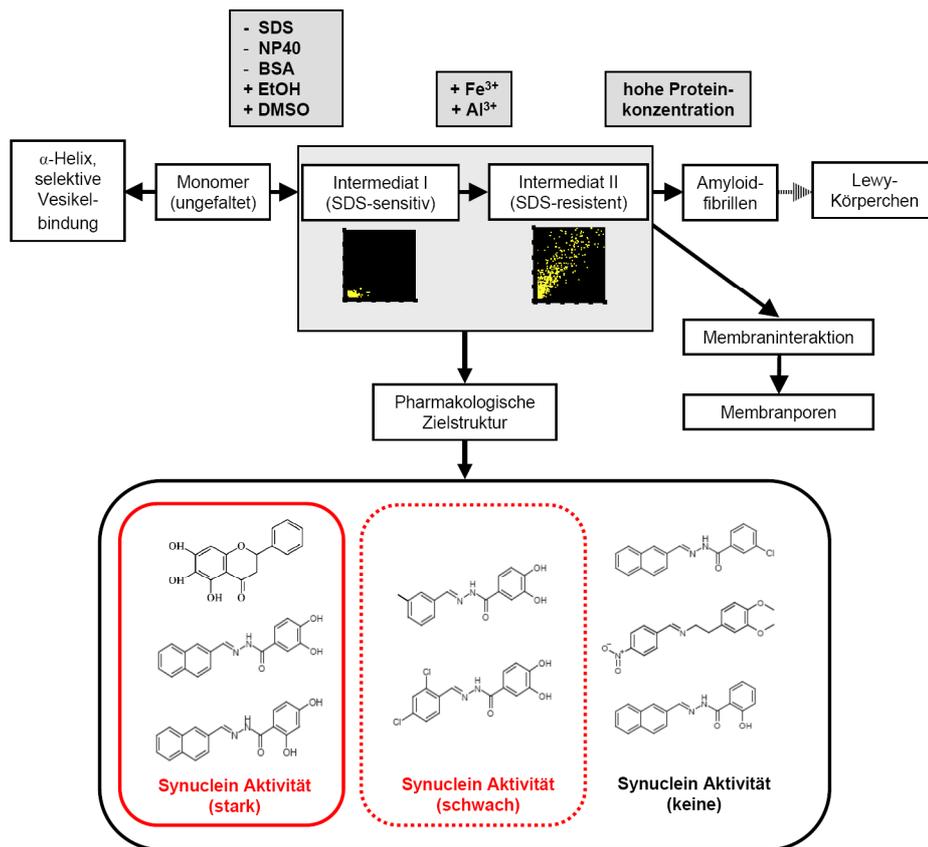


Abb. 4.1. Schematische Darstellung des in dieser Arbeit entwickelten Aggregationsansatzes von α -Synuclein auf Einzelmolekülebene.

4.2. Etablierung eines zweistufigen Aggregationsmodells zur Untersuchung der α -Synucleinoligomerisierung auf Einzelmolekülebene

Wie bereits in der Einleitung zu meiner Arbeit erwähnt, gibt es bis zum heutigen Zeitpunkt für den Morbus Parkinson keine kausal therapeutischen Interventionsmöglichkeiten. Um dieses Ziel in Zukunft dennoch zu erreichen, ist es notwendig, die neurotoxischen Aggregationswege in einem robusten Modellsystem effizient nachzustellen, um damit systematisch potentielle Therapeutika entdecken und testen zu können. Unter Einsatz der konfokalen Einzelmolekülspektroskopie und der Aggregationsinduktoren Ethanol bzw. DMSO ist es zum ersten Mal gelungen, bei einer nanomolaren Proteinkonzentration bereits nach wenigen Stunden kleine α -Synucleinoligomere zu detektieren. Diese ließen sich mittels der verschiedenen einzelmolekülbasierten Analysen als ca. 10-20mere charakterisieren. Diese sog. Intermediat I Oligomere reagierten allerdings auf den Zusatz von Detergenzien und auf Änderungen der Pufferbedingungen äußerst labil (vgl. Ergebnisse 3.2.; 3.3.; 3.10.2). Die Verwendung von organischen Lösungsmitteln in niedrigen Konzentrationen im

Reaktionsansatz mag dabei auf den ersten Blick mit den Bedingungen in einer Zelle oder im Gewebe schwierig zu vereinbaren sein. Bei genauerer Betrachtung und vor dem Hintergrund, dass Oligomerisierungsprozesse mit der Bildung sog. partiell gefalteter intermediärer Aggregate (engl. „partially folded intermediate“) beginnen [45,136,192], lässt sich das von Munshkina *et al.* beschriebene biochemische Hilfsmittel jedoch optimal dazu benutzen, die Faltungsprozesse des natürlich ungefalteten, schwer aggregierbaren α -Synucleins bei einer nanomolaren Proteinkonzentration zu initiieren. Noch dazu wird postuliert, dass die Anwesenheit von Aggregationsinduktoren, wie Ethanol oder DMSO, im Puffersystem ein Milieu generiert, welches der nahen Umgebung von Lipidmembranen ähnelt und daher eine Verknüpfung zwischen *in vitro* und *in vivo* Experimenten herstellt [136]. Auch Kaye und Glabe *et al.* nutzen für die Herstellung bestimmter präfibrillärer bzw. fibrillärer A β -Oligomere und die damit verbundene Entwicklung spezifischer Antikörper gegen präfibrilläre Oligomere (A11-AK) bzw. fibrilläre Oligomere (OC-AK) unter anderem die Wirkungen der Lösungsmittel DMSO und Hexa-Fluor-2-Propanol (HFIP) aus [93,94]. Insgesamt lassen sich durch den Einsatz von Aggregationsinduktoren die Aggregationsprozesse gezielt induzieren und aktiv kontrollieren, was gerade bei den hier verwendeten Reaktionsbedingungen von großem Vorteil war. In Bezug auf den hier neu etablierten Aggregationsansatz könnte die Formation der Intermediat I dadurch erklärt werden, dass sich die Monomere durch eine beginnende Konformationsänderung, wie in der CD-Spektroskopie (vgl. Ergebnisse 3.4.) gezeigt, z.B. über hydrophobe Wechselwirkungen zu einem lockeren, energetisch günstigeren, amyloidogenen Aggregationsnucleus zusammen lagern, der dann in der Folge z.B. durch Wasserstoffbrückenbindungen in seiner Struktur stabilisiert wird [45,56]. Dabei bestimmen die Substratmenge und die Pufferbedingungen das Reaktionsgleichgewicht. Diese ersten Ergebnisse meiner Arbeit waren insofern äußerst interessant und vielversprechend, weil andere Studien in den letzten zehn Jahren wesentlich höhere Proteinkonzentrationen verwenden und z.T. methodenbedingt wesentlich längere Inkubationszeiten festsetzen mussten, um eine Oligomerformation zu erreichen [3,25,45,71,94,193,197]. Dass die Markierung der α -Synucleinmonomere mit den Fluoreszenzfarbstoffen Alexa488 und Alexa647 die aggregativen Eigenschaften des α -Synucleins nicht beeinflusste, zeigten die Ergebnisse aus der CD-Spektroskopie, der Westernblotanalyse, der AFM-Analyse und der Einzelporenelektrophysiologie (vgl. Ergebnisse 3.1.; 3.7; 3.9.). In diesen Untersuchungen verhielten sich das markierte und das unmarkierte α -Synuclein immer gleichartig. So zeigte sich z.B. in der Westernblotanalyse, dass markiertes und unmarkiertes α -Synuclein im 15 %

Polyacrylamidgel korrespondierend auf der gleichen Höhe liefen. Die Kopplung des Fluoreszenzfarbstoffes an das Proteinmonomer hatte auch keinen Einfluss auf den Oligomerisierungsprozess, wie in der AFM-Analyse der Intermediat I und II Oligomere dargestellt (vgl. Ergebnisse 3.1. und 3.7.). Auch der Einsatz von markiertem und unmarkiertem α -Synuclein im Rahmen der elektrophysiologischen Einzelporenmessung zeigte unter gleichen Reaktionsbedingungen vergleichbare Ergebnisse (vgl. Ergebnisse 3.9.). Auch Studien zum Prionprotein bzw. der PolyQ-Erkrankungen, die ebenfalls fluoreszenzmarkierte Proteine für die konfokale Einzelmolekülspektroskopie verwendeten, deuteten an, dass die kovalente Markierung die Eigenschaften der Proteinmonomere nicht wesentlich veränderte [9,54,115].

Nachdem die Intermediat I Oligomere nicht in der Lage waren, sich bei nanomolaren Proteinkonzentrationen in größere Aggregate oder Fibrillen weiter zu entwickeln, gab es Grund zur Annahme, dass die Oligomere unter diesen Bedingungen entweder auf Grund eines Substratmangels oder auf Grund des Fehlens von proaggregativen Ko-Faktoren kinetisch gefangen waren. Um weiterhin die konfokale Einzelmolekülspektroskopie verwenden zu können, mit der es möglich ist, verschiedene Oligomere zu charakterisieren, ohne den nativen Zustand der Oligomere zu verändern, sollte die Proteinkonzentration unverändert bleiben. Ich fokussierte mich deshalb auf den Effekt von Metallionen, der bei vielen neurodegenerativen Erkrankungen intensiv diskutiert wird [11,54,115,193]. In den einzelmolekülbasierten Experimenten war dabei eine der wichtigsten Beobachtungen die Eigenschaft des dreiwertigen Eisenions (Fe^{3+}), im zweistufigen Aggregationsprozess deutlich größere porenbildende Oligomerspezies (100-200mere) zu induzieren (vgl. Ergebnisse 3.5.). In Anbetracht der Ätiologie des Morbus Parkinson könnte diese Entdeckung eine Erklärung dafür bieten, warum bei Parkinson Patienten zentralnervöse Areale mit einem höheren Eisengehalt deutlich stärker von neurodegenerativen Veränderungen betroffen sind [48,64,209]. Mittels der transcraniellen Ultraschalluntersuchung konnte kürzlich belegt werden, dass Parkinson Patienten aber auch bereits asymptomatische Mutationsträger mit familiärem Parkinson Hintergrund eisenbedingte Signalalterationen in der Substantia nigra zeigen [10]. Zudem fand sich in postmortalen Gewebeuntersuchungen der Substantia nigra von Parkinson Patienten nicht nur ein um 35 % erhöhter Eisenspiegel, sondern auch eine Verschiebung des $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ -Verhältnisses zu Gunsten von Fe^{3+} [163,177,209]. Dies geht mit den in dieser Arbeit beschriebenen molekularen Ergebnissen konform, dass Intermediat II Oligomere spezifisch durch die Zugabe von FeCl_3 und nicht durch FeCl_2 induziert werden

konnten (vgl. Ergebnisse 3.10.3.). Interessanterweise offenbarten auch *in vivo* Versuche am Mausmodell eine progressive Neurodegeneration des Mittelhirns, wenn den Tieren mit der Nahrung größere Mengen Eisen während einer frühen Entwicklungsphase, entsprechend der des Menschen im ersten Lebensjahr, verabreicht wurde [90]. In diesem Zusammenhang beschrieben Tofaris *et al.* kürzlich den Fall eines 22-jährigen Patienten mit einer sporadischen Neurodegeneration, der mittels einer Kernspinuntersuchung einen pathologischen Eisenstoffwechsel mit konsekutiver Eisenanhäufung im zentralnervösen, subcorticalen Gewebe zeigte und in der neuropathologischen Untersuchung α -Synuclein-positive Ablagerungen erkennen ließ [186]. Dies könnte auf eine molekulare Verbindung zwischen Eisen- und α -Synucleinablagerungen hindeuten. Ausgehend von den gewonnenen Ergebnissen (vgl. 3.5 und 3.10.) scheint es aber so zu sein, dass der proaggregative synergistische Eiseneffekt auf Einzelmolekülebene, im Gegensatz zu den bisher in der Literatur beschriebenen Mechanismen, nicht auf einer α -Synucleinoxidation und eine dadurch gesteigerte Proteinaggregation zurückzuführen ist [209], sondern vielmehr von der Gegenwart des dreiwertigen Ions (Fe^{3+}) an sich abhängig ist. Durch die Bindung des Fe^{3+} -Ions an den sperrigen, negativ geladenen C-Terminus der α -Synucleinmonomere im Intermediat I könnte es zu einer metallionenabhängigen Verminderung der elektrostatischen Abstoßung und somit zu einer strukturellen Veränderung bzw. Stabilisierung der labilen Intermediat I mit einer erhöhten Aggregationstendenz innerhalb des beschriebenen stufenhaften Aggregationsmodells kommen [127,148,193]. Diesen direkten Ioneneinfluss, im Gegensatz zu einer Wirkung über Redoxreaktionen, bestätigten sowohl die Experimente in Gegenwart des Reduktionsmittels Vitamin C als auch die Experimente mit anderen dreiwertigen Ionen wie Al^{3+} . Für Al^{3+} gibt es kein zweiwertiges redoxaktives Pendant, es ist aber in der Lage, ähnliche ionenabhängige Effekte wie Fe^{3+} zu erzeugen. Analog dazu hatten alle weiteren getesteten zweiwertigen Ionen keinen aggregationsfördernden Einfluss in der konfokalen Einzelmolekülspektroskopie (vgl. Ergebnisse 3.5. und 3.10.).

Mit der AFM-Analyse als weiterer einzelpartikelbasierter Analysetechnik konnte der stufenweise Aggregationsprozess ebenfalls visualisiert und somit validiert werden. Die Oligomere besaßen dabei eine rundliche Struktur und offenbarten eine Höhe von ca. 2-3 nm (Intermediat I) bzw. 4-6,5 nm (Intermediat II) (vgl. Ergebnisse 3.7.). Dies geht einher mit den Ergebnissen von Apetri *et al.*, die mit zwei unterschiedlichen Aggregationsschemata bei einer höheren Proteinkonzentration von 300 μM ebenfalls kleine (1,4-3,5 nm) und größere sphärische (3,9-7,5 nm) α -Synucleinoligomere mittels der AFM detektieren konnten [3].

Auch angesichts weiterer Resultate anderer *in vitro* Aggregationsstudien, die gleichfalls die Formation löslicher, nicht fibrillärer oligomerer Spezies mit einer Höhe zwischen 2 nm und 6 nm beschreiben [25,34,45,61], ist die AFM zusammengefasst eine hervorragende zusätzliche Methode zum Nachweis morphologisch verschiedener Strukturen auf Einzelpartikelebene. Auch kann damit die Anwesenheit verschiedener Aggregatspezies fluoreszenzunabhängig kontrolliert werden [3,45] und somit ein störender Effekt des für die fluoreszenzbasierte Einzelmolekülspektroskopie verwendeten Farbstoffes ausgeschlossen werden. Für eine noch exaktere Strukturanalyse der Oligomere könnte sich in Zukunft das photochemische Crosslinking (engl. für Quervernetzen) eignen, welches bereits für die Stabilisierung von Prionproteinaggregaten am ZNP der LMU München etabliert ist [154]. Damit werden Tyrosinreste im Aggregat durch eine lichtinduzierte, chemische Reaktion kovalent miteinander verknüpft, so dass die Aggregate auch unter denaturierenden Bedingungen im Gelsystem oder auch in der Röntgenstrukturanalyse bzw. im NMR genauer analysiert werden können. Auch das artifizielle Inserieren der Aminosäure Cystein (das in der Primärstruktur des α -Synucleins nicht vorkommt) an spezifischen Positionen innerhalb des α -Synucleinmonomers könnte zur Klärung der für die Bindung bzw. Aggregation verantwortlichen Domänen beitragen. Durch eine unterschiedliche Fluoreszenzmarkierung (grün/rot) zweier verschiedener Cysteinmutanten an verschiedenen Stellen, von der N- bis zur C-terminalen Domäne reichend, könnte die räumliche Struktur im Falle einer Aggregatbildung mittels der intermolekularen FRET-Methode in der konfokalen Einzelmolekülspektroskopie näher beleuchtet werden. Dies könnte eine Charakterisierung der inneren Struktur verschiedener α -Synucleinoligomeren dahingehend ermöglichen, wie und in welcher Weise sich „N-Terminus mit N-Terminus“ oder „C-Terminus mit N-Terminus“ o.ä. in den Oligomeren verschiedener Cysteinmutanten zusammenlagern [101].

4.3. Strukturelle und pathophysiologische Verknüpfungen zu *in vivo* relevanten Oligomeren

Das im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelte Konzept eines stufenartigen Oligomerisationsprozesses und die damit postulierte Änderung der Aggregatstruktur wird aber nicht nur durch den synergistischen Eiseneffekt und die AFM-Daten belegt, sondern beruht auch auf den Ergebnissen zur beschriebenen Detergensresistenz der Intermediat II Oligomere. Diese Eigenschaft weist auch auf strukturelle Gemeinsamkeiten mit *in vivo* detektierten Aggregaten hin. Während SDS die *de novo* Bildung beider Aggregatspezies

(Intermediat I und II) verhinderte und sich präformierte Intermediat I Oligomere als SDS-sensitiv erwiesen, offenbarten die Intermediat II Oligomere eine deutliche SDS-Resistenz (vgl. Ergebnisse 3.10.2.). Dies deutet auf einen mehrschrittigen Prozess hin, bei dem die Intermediat I Oligomere nötig sind, um zusammen mit Metallionen Intermediat II Oligomere zu formieren. Diese besitzen dann offenbar eine andere, SDS-resistente Konformation. Die Relevanz dieser Daten wird u.a. durch Isolierung von detergensresistenten α -Synucleinoligomeren [86,175], einschließlich oligomerer Aggregatspezies mit einer ringförmigen Struktur [157], aus humanem zentralnervösem Gewebe von Patienten mit Morbus Parkinson bzw. MSA und aus transgenen Tiermodellen untermauert. Die detergensabhängigen Experimente haben aber nicht nur Bedeutung für die strukturelle Unterscheidung der verschiedenen Aggregatspezies, sie ermöglichen auch, funktionelle Unterschiede zu eruieren. So war die Zugabe von SDS entscheidend für den Nachweis, dass es nicht die α -Synucleinmonomere sondern die Intermediat II Oligomere sind, die sich an POPC-Phospholipidvesikel binden (vgl. Ergebnisse 3.10.4.). Dagegen hatten unter allen Bedingungen die DPPC-Vesikel, d.h. Lipidvesikel im sog. „gel-state“, nur monomeres α -Synuclein gebunden [87,141] und dadurch die Aggregationsprozesse, vermutlich auf Grund des Substratmangels, blockiert. Dieser gesamte abgestufte Reaktionsansatz (Abb.4.1.), stellt somit ein gut funktionierendes *in vitro* Modellsystem dar, um in Zukunft auf Einzelmolekülebene die Interaktion von α -Synucleinmonomeren bzw. -oligomeren mit Lipidvesikeln oder Zellorganellen, wie z.B. Mitochondrien, effizient zu untersuchen.

Wie in meiner Arbeit dargestellt, konnte mit o.g. Reaktionsansatz auch das Ziel erreicht werden, eine potentiell toxische Oligomerspezies zu identifizieren, die hinsichtlich der *in vivo* Relevanz der dargestellten Aggregatspezies interessant war. Die Tatsache, dass die Intermediat II Oligomere - im Gegensatz zu den Intermediat I Oligomeren - in einem Lipid-Doppelschichtsystem Poren bildeten und die Leitfähigkeit verändern konnten (vgl. Ergebnisse 3.9.), ist unter pathophysiologischen Gesichtspunkten bemerkenswert. Zum Einen spiegelt diese Eigenschaft eine der aktuellen wissenschaftlichen Annahmen bzgl. der Pathophysiologie beim Morbus Parkinson wieder [55,107,196,200], zum Anderen lässt sie die Intermediat I Oligomere, aber auch die Intermediat II Oligomere als therapeutisches Zielsystem in Erwägung ziehen, was bei einer „nicht toxischen“ Spezies nicht relevant gewesen wäre. Als weitere Indizien für die Relevanz der Ergebnisse meiner *in vitro* Versuche für pathophysiologische Prozesse *in vivo* konnten Danzer *et al.*, basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit, mit drei verschiedenen durch Lyophilisierungs- und Zentrifugationsschritten

modifizierten Protokollen für Ethanol- bzw. Ethanol/Fe³⁺-induzierte Oligomere in Zellkulturexperimenten einerseits einen zellulären Ca²⁺-Einstrom und andererseits ein intrazelluläres „ α -Synuclein-Seeding“ beobachten [27]. Wie auch im Ergebnisteil (3.10.1) kurz angesprochen, lieferten ferner Pilotversuche an autaptischen Neuronenzellkulturen (Zusammenarbeit mit Sandra Paluch, Promotionsarbeit Sandra Paluch, AG Prof. Herms, ZNP, LMU München; noch nicht publizierte Daten) weitere Hinweise auf eine *in vivo* Relevanz. Oligomere, die durch die Inkubation von 10 μ M α -Synuclein in Gegenwart von 1 % DMSO und 10 μ M Fe³⁺ induziert wurden, erhöhten nach Zugabe auf eine autaptische Neuronenzellkultur die präsynaptische, intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration in Patch-Clamp-Messungen. Unter ähnlichen Bedingungen konnte in der Kooperation mit Mario Caruana (Promotionsarbeit Mario Caruana, AG Dr. Vassallo, Universität Malta, Msida, Malta; noch nicht publizierte Daten) aufgezeigt werden, dass spezifisch DMSO/Fe³⁺-induzierte Oligomere in der Lage waren, mit dem Farbstoff Oregon-Green-BAPTA gefüllte Liposomen zu permeabilisieren, was in einer Ca²⁺-abhängigen Fluoreszenzreaktion detektierbar gemacht werden konnte.

Um der Frage nachzugehen, ob und in wieweit die potentiell toxischen Intermediat II Oligomere auch strukturelle Ähnlichkeiten mit Oligomerspezies anderer Proteinherkunft besitzen, wurde der oligomerspezifische Antikörper A11 in dieser Arbeit verwendet. Untersuchungen unter der Führung von Kaye und Glabe *et al.* in den letzten Jahren weisen darauf hin, dass Oligomere verschiedener amyloidogener Proteine strukturelle Merkmale (Epitope) gemeinsam haben und einen ähnlichen pathophysiologischen Mechanismus in Form einer Veränderung der Membranleitfähigkeit besitzen [55,56,92,94,204]. In diesem Zusammenhang war der Einsatz des oligomerspezifischen Antikörpers A11 auch in dieser Arbeit von großer Wichtigkeit. Kaye und Glabe *et al.* konnten zeigen, dass dieser Antikörper verschiedene präfibrilläre Oligomerspezies unterschiedlichen Proteinursprungs, beispielsweise A β , Polyglutamin, α -Synuclein, Insulin, IAPP (Amylin) u.a., detektierte und krankheitsspezifische Proteinaggregate bei einer Vielzahl humaner Erkrankungen nachweisen konnte. Monomere oder Fibrillen wurden durch diesen Antikörper hingegen nicht erkannt. [57,94,97,121,167]. Ferner war der A11-AK in der Lage, die Oligomertoxizität in Zellkulturexperimenten zu verhindern [94]. Darüber hinaus konnte der A11 auch die hämolytische und membranpermeabilisierende Aktivität des bakteriellen α -Hämolsins und des humanen Perforins unterbinden. Dabei reagierte der A11-AK nur mit den porenbildenden α -Hämolsin- bzw. Perforin-abhängigen Oligomeren und nicht mit den entsprechenden

Monomeren, was ein weiterer Hinweis auf die strukturelle und funktionelle Gemeinsamkeit zwischen amyloiden toxischen Oligomeren und porenbildenden Toxinen ist [204]. Die Tatsache, dass der Antikörper A11 in den elektrophysiologischen Versuchen meiner Arbeit die Intermediat II bedingte Porenbildung blockierte und die Leitfähigkeit bereits formierter, integrierter Membranporen reduzierte, weist darauf hin, dass die *in vitro* generierten Intermediat II Oligomere strukturelle Gemeinsamkeiten mit *in vivo* relevanten Oligomeren besitzen könnten (vgl. Ergebnisse 3.9.). Möglicherweise sind die hier in einem zellfreien Ansatz charakterisierten eiseninduzierten porenbildenden Aggregatspezies in dieser oder ähnlicher Form auch im Hirngewebe betroffener Morbus Parkinson Patienten zu finden. Der Antikörper A11 konnte nämlich in zentralnervösen Gewebeproben von Alzheimer Patienten, sowie von Patienten mit beginnender kognitiver Beeinträchtigung (engl. „mild cognitive impairment“), ebenfalls oligomerverdächtige Strukturen nachweisen [94]. Interessant wäre in diesem Zusammenhang, auch den von Kaye *et. al* entwickelten CO-Antikörper künftig u.a. in meinem Reaktionsansatz und der Elektrophysiologie zu testen. Dieser Antikörper detektiert keine präfibrillären, A11-positiven Oligomere, sondern nur fibrilläre Oligomere, sowie fibrilläre Strukturen und Amyloidablagerungen u.a. in Gewebeproben mit Alzheimer-typischen Veränderungen, die nicht vom A11-AK erkannt werden [93]. Dies könnte hilfreich sein, um die verschiedenen Aggregatspezies innerhalb von Aggregationsprozessen noch deutlicher voneinander zu unterscheiden und das entwickelte Aggregationsmodell weiter zu verfeinern.

Die Isolierung *in vivo* relevanter Oligomere aus humanem Gewebe [157] oder Liquorproben [15,53] von Parkinson Patienten, deren biochemischer Nachweis (z.B. mittels A11 [94]) und die funktionelle Charakterisierung, insbesondere auf Einzelmolekül- und elektrophysiologischer Ebene, könnten ein weiterer Schritt sein, um die pathophysiologische Rolle der α -Synucleinoligomere genauer zu verstehen. Ferner wäre auch analog zu Giese *et al.* [52] der Einsatz von α -Synucleinmutanten (A53T, A30P, E46K) und der Synucleinhomologe (β - und γ -Synuclein) im etablierten konfokalen einzelmolekülbasierten Aggregationsansatz interessant, um funktionelle und strukturelle Eigenschaften dieser Proteinfamilie noch besser erforschen und unterscheiden zu können.

4.4. Identifizierung von potentiell kausal therapeutischen Wirksubstanzen

Mit der Etablierung des beschriebenen mehrstufigen Aggregationsmodells waren nicht nur die Grundlage zur Untersuchung von Oligomerisierungsprozessen und die Charakterisierung hinsichtlich der pathophysiologischen Relevanz geschaffen, sondern auch mit den Intermediat I Oligomeren eine interessante pharmakologische Zielstruktur gefunden für die Identifizierung und Entwicklung neuer therapeutischer Wirksubstanzen. Die konfokale Einzelmolekülspektroskopie, insbesondere die SIFT-Methode, bot sich hierfür als äußerst effiziente Technik an, mit der in kurzer Zeit, in kleinsten Probenvolumina und mit geringem Materialverbrauch nach anti-aggregativen Substanzen gesucht werden konnte. In einer ersten Pilotstudie am ZNP München wurden acht ausgewählte *in vitro* und *in vivo* getestete Anti-Prion- bzw. Anti-PolyQ-Substanzen der Substanzklasse der N'-Benzyliden-Benzohydrazide (NBB) verwendet [12,169], von denen vier Substanzen im zellfreien, SIFT-basierten Aggregationsansatz auch die Oligomerisierung von α -Synuclein verhindern bzw. vermindern konnten. Dabei zeigte sich eine klare Struktur-Wirkungs-Beziehung zwischen der Aktivität der Substanzen und der Anwesenheit von zwei Hydroxyl-Gruppen am Benzohydrazidring der Verbindungen (vgl. Ergebnisse 3.11.). Das Flavonoid Baicalein war ebenfalls in der Lage, die Bildung der beschriebenen oligomeren α -Synucleinaggregate auf Einzelmolekülebene zu verhindern. Bezüglich der inhibitorischen Wirkungsweise des Baicaleins konnte von Zhu *et al.* [212] gezeigt werden, dass Baicalein in Gegenwart von mikromolaren α -Synucleinkonzentrationen die Amyloidbildung *in vitro* inhibiert. Dieser Wirkungsmechanismus wurde dadurch erklärt, dass Baicalein infolge Oxidation der am Ringsystem vorhandenen Hydroxyl-Gruppen zu Bacalin, einem Chinon, umgewandelt wird, um dann mit den Lysinresten des α -Synucleins eine Schiffsche-Base-Reaktion zu bilden und durch diese kovalente Modifikation den Fibrillierungsprozess des α -Synucleins inhibiert [212]. Im Gegensatz zu Baicalein ist der genaue Mechanismus und der Angriffspunkt der NBB-Substanzen im Zusammenhang mit der α -Synucleinaggregation bisher nicht beschrieben worden. Denkbar wäre aber eine ähnliche oxidationsbedingte Reaktion wie bei Baicalein oder aber auch eine Inhibierung der Monomer- bzw. Oligomeranlagerung an randständige bzw. endständige Strukturen größerer Oligomeraggregate - ähnlich dem Wirkprinzip im PolyQ-Aggregationsmodell. Dort wird von Schiffer *et al.* diskutiert, dass im Rahmen der PolyQ-Aggregation die NBBs die endständige Anlagerung weiterer Peptide an die Protofibrillen unterbinden könnten [169]. Auch Bertsch *et al.* favorisieren für die Inhibierung der PrP^{Sc}-

Amplifikation, sowohl im zellfreien SIFT-Modell, als auch im Zellkulturmodell mit Scrapie-infizierten ScN2a Zellen einen ähnlichen Mechanismus der NBBs [12].

Der Vollständigkeit halber sollte an dieser Stelle noch kurz das Ergebnis zweier weiterer Kooperationsprojekte erwähnt werden. In Kooperation mit Professor Christopher Ross (Johns Hopkins Universität Baltimore, USA) und Professor Pamela McLean (Harvard Medical School, Boston, USA) wurden sowohl Baicalein (Prof. Ross) als auch einige der NBB Substanzen (Prof. McLean, Promotionsarbeit von Andreas Hillmer am ZNP, LMU München) in verschiedenen Zellkulturmodellen erfolgreich eingesetzt (Kostka und Högen *et al.* 2008 [100] sowie unveröffentlichte Daten der AG Giese/McLean, ZNP LMU München und Harvard Medical School, Boston). Ziel war es, herauszufinden, ob die *in vitro* wirksamen Substanzen auch *in vivo* einen Effekt zeigen würden. Nachdem am ZNP der LMU München bisher kein diesbezügliches Zellkulturmodell etabliert ist, wurden die Versuche in den USA durchgeführt. Professor Ross wies dabei nach, dass das im molekularen Aggregationsmodell wirksame Baicalein in einem zellulären α -Synuclein-abhängigen Toxizitätsmodell den Zelltod dosisabhängig verhindern kann. In dieser speziellen Zellkultur (einer durch den Entzug von Doxycyclin E46K- α -Synuclein überexprimierenden Tet-Off PC 12 Zellkultur), die keine fibrillären Aggregate aufweist, deren Toxizität aber durch die Überexpression von α -Synuclein und den dadurch assoziierten endoplasmatischen Retikulumstress bzw. durch mitochondriale Dysfunktion bedingt ist, konnte der Zelltod durch Baicalein deutlich verhindert werden [100]. Durch die Abwesenheit von Fibrillen in diesem speziellen Zellkulturmodell konnte eine Deaggregation existierender Fibrillen, wie sie für Baicalein beschrieben wurde [212], als anti-toxischer Mechanismus ausgeschlossen werden. Im Abgleich mit den SIFT-Daten weist dies darauf hin, dass im verwendeten Zellkulturmodell Baicalein aller Wahrscheinlichkeit nach die Bildung von toxischen Oligomeren verhindern kann. In einer weiteren Kooperation mit Pamela McLean konnte Andreas Hillmer vom ZNP der LMU München die von mir gefundenen, wirksamen NBB Substanzen in einem ähnlichen wie von Outiero und McLean *et al.* [147] publizierten Zellkulturmodell (engl. „BPCA-Bioluminescence Protein Complementation Assay“, Proteinkomplementationsansatz) testen. Dabei zeigte sich, dass die α -Synucleinoligomerisierung in H4 Neurogliomazellen, die transient mit zwei verschiedenen α -Synuclein-Luziferase-Konstrukten infiziert worden waren, deutlich durch die NBB-Substanzen 293G02 und 301C09 vermindert wurde. Die im SIFT-Ansatz wirkungslose Substanz 306H03 zeigte hingegen keinen Effekt (Promotionsarbeit Andreas Hillmer, AG Giese, ZNP, LMU München; noch unveröffentlichte Daten). Die

Zusammenschau der Ergebnisse aus der Substanztestung im zellfreien einzelmolekülbasierten SIFT-Ansatz und aus der Aggregationsinhibition im α -Synuclein-abhängigen Zellkulturmodell könnte dafür sprechen, dass die *in vitro* generierten und charakterisierten Oligomere auch unter physiologischen Bedingungen in neuronalen Zellen vorkommen und dabei eine signifikante Rolle spielen.

Zusammenfassend beschreiben die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse somit einen potentiellen Krankheitsmechanismus toxischer Oligomerspezies in Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen: Der Oligomerisierungsprozess von α -Synuclein scheint ein definierter, mehrstufiger Prozess sein, der entscheidend durch die Anwesenheit von Fe^{3+} beeinflusst wird und letztendlich zur Formation porenbildender Oligomerspezies führt. Eine detaillierte biophysikalische und elektrophysiologische Charakterisierung von porenbildenden Oligomeren auf Einzelmolekülebene wurde bisher noch nicht publiziert. Die Ergebnisse bezüglich der inhibitorischen Wirkung verschiedener Substanzen auf die α -Synucleinaggregation im konfokalen, einzelmolekülbasierten Aggregationsansatz könnten somit den Ausgangspunkt für die Entwicklung neuer, kausal wirkender Pharmaka bieten. Nachdem sich die konfokale Einzelmolekülspektroskopie hervorragend für ein molekulares Hochdurchsatzverfahren eignet, wurde auf der Basis des in dieser Arbeit entwickelten Aggregationsansatzes nicht nur in einem molekularen Screening am ZNP der LMU München vier potentiell kausal therapeutische NBB-Substanzen identifiziert (Patent WO 2005/116640 (Patenerteilung am 08.10.2008)), sondern auch in einer Kollaboration mit Boehringer-Ingelheim ein automatisiertes, pharmakologisches Substanzenscreening von 830.000 verschiedenen chemischen Verbindungen durchgeführt. Die hier gewonnenen Informationen und Substanzen werden derzeit in weiterer pharmakologischer Testung verfolgt.

5. Zusammenfassung

Die Bildung pathologischer Proteinaggregate ist ein zentraler Schritt in der molekularen Pathogenese bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen. Der Morbus Parkinson ist neuropathologisch charakterisiert durch pathologische Ablagerungen aggregierten α -Synucleins, unter anderem in Form der intrazytoplasmatischen Lewy-Körperchen, und durch die Degeneration von dopaminergen Neuronen. Es mehren sich Hinweise dafür, dass nicht die großen, fibrillären, lichtmikroskopisch sichtbaren Aggregatstrukturen, sondern vielmehr oligomere α -Synucleinaggregate die wesentliche toxische Spezies darstellen. Es wird diskutiert, dass Eisenionen den Verlauf des Morbus Parkinson beeinflussen, da zum Einen in Lewy-Körperchen und der Substantia nigra ein signifikant höherer Eisengehalt gefunden wurde und zum Anderen in zentralnervösem Gewebe von idiopathischen Parkinson Patienten eine Korrelation zwischen erhöhtem Eisengehalt und dem Grad der neuropathologischen Veränderungen besteht. Die genauen molekularen Mechanismen sind jedoch noch nicht vollständig verstanden. Deshalb war das Ziel meiner Arbeit, zum Verständnis der molekularen Ereignisse hinsichtlich der Bildung und der Toxizität von α -Synucleinoligomeren beizutragen und die Rolle von Eisenionen beim Morbus Parkinson zu untersuchen.

Die Aggregations- und Oligomerisierungsprozesse des α -Synucleins wurden dabei insbesondere mittels verschiedener Techniken der konfokalen Einzelmolekülspektroskopie, wie der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS), der Fluoreszenzintensitätsverteilungsanalyse (FIDA) und dem Scannen nach hochintens fluoreszierenden Zielstrukturen (SIFT), analysiert. Dafür wurden zunächst ein Protokoll für die Fluoreszenzmarkierung des α -Synucleins und ein spezieller Aggregationsansatz für die konfokale Einzelmolekülspektroskopie entwickelt. Die einzelmolekülspektroskopischen Analysen wurde ergänzt und validiert mittels „klassischer“ biochemischer und biophysikalischer Methoden, wie insbesondere der Westernblotanalyse, der Thioflavin T Fluoreszenz, der CD-Spektroskopie und der Rasterkraftmikroskopie (AFM). Eine funktionelle, pathophysiologische Charakterisierung verschiedener Aggregationsformen des α -Synucleins erfolgte im Rahmen von Bindungsstudien der Monomere und der verschiedenen Aggregatspezies an Lipidvesikel und durch elektrophysiologische Einzelkanalmessungen in einem Lipid-Doppelschichtsystem. Organische Lösungsmittel wie DMSO und Ethanol wurden als ein biochemisches Hilfsmittel verwendet, um die Aggregation des unter normalen Pufferbedingungen natürlich ungefalteten α -Synucleins zu fördern.

In der Kombination dieser Methoden konnten zum ersten Mal zwei verschiedene Oligomerspezies charakterisiert werden, die sich in ihrer strukturellen und funktionellen Eigenschaft deutlich unterschieden. Die Gegenwart von organischen Lösungsmitteln führte zur Bildung kleiner oligomerer Aggregate („Intermediat I“). Unter diesen Bedingungen verstärkte die Zugabe von Fe^{3+} -Ionen den Aggregationsprozess und induzierte die Formation wesentlich größerer Oligomerspezies („Intermediat II“). Beide Oligomerformen waren in der Lage, sich bei höherer Proteinkonzentration und längerer Inkubationszeit zu Amyloidfibrillen weiter zu entwickeln. Bemerkenswerterweise waren in Deaggregationsstudien nur die Fe^{3+} -induzierten Oligomere SDS-resistent. Zusätzlich besaßen die Intermediat II Oligomere im Gegensatz zu den α -Synucleinmonomeren und den Intermediat I Oligomeren die Eigenschaft, an unilamellare, flüssig-kristalline POPC-Vesikel (Palmitoyl-Oleoyl-Phosphatidylcholin) zu binden. Stark gekrümmte, im „gel-state“ befindliche DPPC-Vesikel (Dipalmitoyl-Oleoyl-Phosphatidylcholin) vermochten dagegen die α -Synucleinmonomere zu binden und konnten dadurch den Aggregationsprozess unterbinden. Hinsichtlich eines potentiellen toxischen Effekts konnte in einer Pilotstudie gezeigt werden, dass nur die Intermediat II Oligomere ionendurchlässige Poren in einem planaren Lipid-Doppelschichtsystem ausbildeten. Die Gegenwart des oligomerspezifischen Antikörpers A11 verhinderte die Porenbildung. Mit dem Ziel, potentiell kausal therapeutische, anti-aggregative Wirksubstanzen mittels des entwickelten Modellsystems zu entdecken, wurde ein einzelmolekülbasierter α -Synucleinaggregationsansatz für ein Hochdurchsatzverfahren entwickelt und die nicht toxischen Intermediat I Oligomere als pharmakologische Zielstruktur ausgewählt. In einer Pilotstudie konnten neben Baicalein vier N'-Benzyliden-Benzohydrazid-Derivate identifiziert werden, die eine inhibierende Wirkung auf den Oligomerisierungsprozess hatten.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse untermauern die Rolle von dreiwertigen Eisenionen und bestimmten toxischen α -Synucleinoligomeren hinsichtlich der molekularen pathophysiologischen Prozesse beim Morbus Parkinson. Gleichzeitig liefert das entwickelte experimentelle Modellsystem die Möglichkeit, pathologische Aggregationsprozesse auf Einzelmolekülebene effizient zu analysieren. Es erlaubt ferner, nach möglichen Aggregationsinhibitoren im Hochdurchsatzverfahren zu screenen und damit die Medikamentenentwicklung für eine kausale Therapie des Morbus Parkinson voranzutreiben.

6. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AD	Morbus Alzheimer
AFM	(= atomic force microscopy) Rasterkraftmikroskopie
AK	Antikörper
Al	Aluminium
APAAP	Alkaline Phosphatase-Anti-Alkaline Phosphatase
BSA	Bovines Serumalbumin
CPP	(= counts per particle) mittlere Helligkeit der Partikel
CD	Circular-Dichroismus
DMSO	Dimethylsulfoxid
DLB	(= dementia with lewy bodies) Demenz mit Lewy-Körperchen
DPPC	Dipalmitoyl-Oleyl-Phosphatidylcholin
Eth	Ethanol
EP	Elektrophysiologie
Fe	Eisen
FeCl ₃	Eisen (III)-Chlorid
FCS	Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie
FIDA	Fluoreszenzintensitätsverteilungshistogramm
FRET	(= fluorescence resonance energy transfer) Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
GCI	(= glial cytoplasmic inclusions) Gliale zytoplasmatische Einschlüsse
H.E.	Hämatoxilin-Eosin
I _{tot}	Gesamthelligkeit
kDa	Kilo-Dalton
LBD	(= lewy body disease) Lewy-Körperchen-Erkrankung
LK	Lewy-Körperchen
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität München
LN	Lewy-Neurit
M	Molar
mM	Millimolar
μM	Mikromolar
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin

MSA	Multiple Systematrophie
N	Partikelzahl
NAC	(= non-amyloid- β -component) Nicht-Amyloid-Beta Komponente
NACP	(= non-amyloid- β -component-precursor) Vorläufer der nicht-Amyloid-Beta Komponente
NBB	N'-Benzyliden-Benzohydrazide
NMR	(= nuclear magnetic resonance) Kernspinresonanz
NP-40	Detergens NP-40 (Igepal)
PK	Proteinase K
POPC	Palmitoyl-Oleyl-Phosphatidylcholin
PPX	(-)-2-Amino-6-n-Propylamino-4,4,5,6,7-Tetrahydrobenzo-Thiazol
RFU	(= relative fluorescence units) Relative Fluoreszenzeinheiten
RT	Raumtemperatur
SDS	(= sodiumdodecylsulfat) Detergens, Natriumdodecylsulfat
SIFT	(= scanning for intensely fluorescent targets) Scannen nach hochintens fluoreszierenden Zielstrukturen
SND919	(+)-2-Amino-6-n-Propylamino-4,4,5,6,7-Tetrahydrobenzo-Thiazol
SUV	(= small unilamellar vesicle) Kleine unilamellare Vesikel
Tab.	Tabelle
T _{Diff}	mittlere Diffusionszeit
ThT	Thioflavin T
Vit. C	Vitamin C
V/V	Volumen pro Volumen (Volumenprozent)
WB	Westernblot
W/V	Gewicht pro Volumen (=Gewichtprozent)
XCorr	Kreuzkorrelation
ZNP	Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung

7. Abbildungsverzeichnis

Nr.:	Titel	Seite
1.1.	Lewy-Körperchen und Lewy-Neurit im histologischen Bild bei Morbus Parkinson	10
1.2.	Schematische Darstellung der humanen α -Synucleindomänen und der Proteinsequenz	14
1.3.	Pathophysiologisches Grundprinzip neurodegenerativer Erkrankungen	21
2.1.	Messaufbau des Insight Readers	32
2.2.	Autokorrelogramm	35
2.3.	Kreuzkorrelation	36
2.4.	FIDA	38
2.5.	2D-FIDA- und SIFT-Methode	40
2.6.	Elektrophysiologische Analyse in einem planaren Lipidbilayersystem	49
3.1.	Westernblotanalyse von markiertem und unmarkiertem α -Synuclein	51
3.2.	Ethanol induziert die Oligomerbildung von α -Synuclein	54
3.3.	Inhibierung der α -Synucleinoligomerbildung durch NP-40 und BSA in direkter Dosiswirkungsbeziehung	56
3.4.	CD-Spektroskopie von α -Synuclein in Gegenwart von Ethanol	57
3.5.	Effekt von Fe^{3+} und anderer Metallionen auf die α -Synucleinoligomerisierung	59
3.6.	Effekt von Fe^{3+} auf die α -Synucleinoligomerisierung	61
3.7.	Wechsel des Puffersystems von NaPi- zu Tris-HCl-Puffer	62
3.8.	Rasterkraftmikroskopie (AFM) von α -Synucleinoligomeren	64
3.9.	α -Synucleinoligomere induzieren die Amyloidbildung	66
3.10.	Elektrophysiologische Analyse von α -Synucleinoligomeren in einem planaren Lipidbilayersystem	69
3.11.	Verwendung von DMSO anstelle von Ethanol als Aggregationsinduktor	71
3.12.	SDS-Resistenz der α -Synuclein-Intermediat II Oligomere	73
3.13.	Spezifischer Effekt von Fe^{3+} -Ionen	74
3.14.	Interaktion von α -Synuclein mit verschiedenen kleinen, unilamellaren Lipidvesikeln	78
3.15.	N'-Benzyliden-Benzohydrazide (NBB) Derivate und Baicalein inhibieren die α -Synucleinaggregation	80
4.1.	Schematische Darstellung des entwickelten Aggregationsansatzes	84

8. Tabellenverzeichnis

Nr.	Titel	Seite
2.1.	Chemikalien	26
2.2.	Materialien	27
2.3.	Fluoreszenzfarbstoffe	27
2.4.	Biologische Materialien	27
2.5.	Antiaggregative Substanzen	28
2.6.	Puffer für die α -Synuclein Markierungsreaktion	28
2.7.	Puffer für die FCS-, CD-, ThT-Messungen und die WB-Analyse	28
2.8.	Verwendete α -Synucleinchargen	29
2.9.	Gelsysteme für die Westerblot-Analyse	41
3.1.	Qualitätskontrolle der α -Synuclein-Markierungsreaktion	50
3.2.	PK-Verdau und Bestimmung der Markierungsrate des α -Synucleins	51
3.3.	Detaillierte quantitative FIDA-Analyse	60
3.4.	AFM-Analyse von α -Synucleinaggregaten	65
3.5.	Porenbildung durch α -Synucleinaggregate	68
3.6.	Inhibierung der α -Synuclein-abhängigen Porenbildung durch AK	70

9. Literaturverzeichnis

- [1] A. Abeliovich, Y.Schmitz, I.Farinas, D.Choi-Lundberg, W.H.Ho, P.E.Castillo, N.Shinsky, J.M.Verdugo, M.Armanini, A.Ryan, M.Hynes, H.Phillips, D.Sulzer, A.Rosenthal, Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system, *Neuron* 25 (2000) 239-252.
- [2] A. Aguzzi and C.Haass, Games played by rogue proteins in prion disorders and Alzheimer's disease, *Science* 302 (2003) 814-818.
- [3] M. M. Apetri, N.C.Maiti, M.G.Zagorski, P.R.Carey, V.E.Anderson, Secondary structure of alpha-synuclein oligomers: characterization by raman and atomic force microscopy, *J.Mol.Biol.* 355 (2006) 63-71.
- [4] S. R. Aragon and R.Pecora, Fluorescence correlation spectroscopy and brownian rotational diffusion, *Biopolymers* 14 (1975) 119-138.
- [5] K. Arima, K.Ueda, N.Sunohara, K.Arakawa, S.Hirai, M.Nakamura, H.Tonozuka-Uehara, M.Kawai, NACP/alpha-synuclein immunoreactivity in fibrillary components of neuronal and oligodendroglial cytoplasmic inclusions in the pontine nuclei in multiple system atrophy, *Acta Neuropathol.* 96 (1998) 439-444.
- [6] K. Bacia and P.Schwille, A dynamic view of cellular processes by in vivo fluorescence auto- and cross-correlation spectroscopy, *Methods* 29 (2003) 74-85.
- [7] B. Bandyopadhyay, G.Li, H.Yin, J.Kuret, Tau aggregation and toxicity in a cell culture model of tauopathy, *J Biol.Chem* 282 (2007) 16454-16464.
- [8] G. Becker, A.Muller, S.Braune, T.Buttner, R.Benecke, W.Greulich, W.Klein, G.Mark, J.Rieke, R.Thumler, Early diagnosis of Parkinson's disease, *J Neurol.* 249 Suppl 3 (2002) III/40-III/48.
- [9] C. Behrends, C.A.Langer, R.Boteva, U.M.Bottcher, M.J.Stemp, G.Schaffar, B.V.Rao, A.Giese, H.Kretzschmar, K.Siegers, F.U.Hartl, Chaperonin TRiC promotes the assembly of polyQ expansion proteins into nontoxic oligomers, *Mol.Cell* 23 (2006) 887-897.
- [10] D. Berg, Disturbance of Iron Metabolism as a Contributing Factor to SN Hyperechogenicity in Parkinson's Disease: Implications for Idiopathic and Monogenetic Forms, *Neurochem.Res.* 32 (2007) 1646-1654.
- [11] D. Berg, M.Gerlach, M.B.Youdim, K.L.Double, L.Zecca, P.Riederer, G.Becker, Brain iron pathways and their relevance to Parkinson's disease, *J.Neurochem.* 79 (2001) 225-236.
- [12] U. Bertsch, K.F.Winklhofer, T.Hirschberger, J.Bieschke, P.Weber, F.U.Hartl, P.Tavan, J.Tatzelt, H.A.Kretzschmar, A.Giese, Systematic identification of antiprion drugs by high-throughput screening based on scanning for intensely fluorescent targets, *J.Virol.* 79 (2005) 7785-7791.

- [13] K. Beyer, Alpha-synuclein structure, posttranslational modification and alternative splicing as aggregation enhancers, *Acta Neuropathol.* 112 (2006) 237-251.
- [14] K. Beyer, Mechanistic aspects of Parkinson's disease: alpha-synuclein and the biomembrane, *Cell Biochem.Biophys* 47 (2007) 285-299.
- [15] J. Bieschke, A.Giese, W.Schulz-Schaeffer, I.Zerr, S.Poser, M.Eigen, H.Kretzschmar, Ultrasensitive detection of pathological prion protein aggregates by dual-color scanning for intensely fluorescent targets, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 97 (2000) 5468-5473.
- [16] H. Braak, K.Del Tredici, U.Rub, R.A.de Vos, E.N.Jansen Steur, E.Braak, Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease, *Neurobiol.Aging* 24 (2003) 197-211.
- [17] H. Braak, D.Sandmann-Keil, W.Gai, E.Braak, Extensive axonal Lewy neurites in Parkinson's disease: a novel pathological feature revealed by alpha-synuclein immunocytochemistry, *Neurosci.Lett.* 265 (1999) 67-69.
- [18] M. Bucciantini, E.Giannoni, F.Chiti, F.Baroni, L.Formigli, J.Zurdo, N.Taddei, G.Ramponi, C.M.Dobson, M.Stefani, Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases, *Nature* 416 (2002) 507-511.
- [19] B. Caughey and P.T.Lansbury, Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders, *Annu.Rev.Neurosci.* 26 (2003) 267-298.
- [20] S. Chandra, G.Gallardo, R.Fernandez-Chacon, O.M.Schluter, T.C.Sudhof, Alpha-synuclein cooperates with CSPalpha in preventing neurodegeneration, *Cell* 123 (2005) 383-396.
- [21] M. C. Chartier-Harlin, J.Kachergus, C.Roumier, V.Mouroux, X.Douay, S.Lincoln, C.Levéque, L.Larvor, J.Andrieux, M.Hulihan, N.Waucquier, L.Defebvre, P.Amouyel, M.Farrer, A.Destee, Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease, *Lancet* 364 (2004) 1167-1169.
- [22] D. F. Clayton and J.M.George, Synucleins in synaptic plasticity and neurodegenerative disorders, *J Neurosci.Res.* 58 (1999) 120-129.
- [23] N. B. Cole, D.D.Murphy, J.Lebowitz, L.Di Noto, R.L.Levine, R.L.Nussbaum, Metal-catalyzed oxidation of alpha-synuclein: helping to define the relationship between oligomers, protofibrils, and filaments, *J.Biol.Chem* 280 (2005) 9678-9690.
- [24] R. J. Colton, (1997) *Procedures in scanning probe microscopy*, John Wiley & Sons, New York, USA, Weinheim, Germany.
- [25] K. A. Conway, S.J.Lee, J.C.Rochet, T.T.Ding, R.E.Williamson, P.T.Lansbury, Jr., Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both alpha-synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: implications for pathogenesis and therapy, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 97 (2000) 571-576.

- [26] L. T. Costa, M.Kerkmann, G.Hartmann, S.Endres, P.M.Bisch, W.M.Heckl, S.Thalhammer, Structural studies of oligonucleotides containing G-quadruplex motifs using AFM, *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 313 (2004) 1065-1072.
- [27] K. M. Danzer, D.Haasen, A.R.Karow, S.Moussaud, M.Habeck, A.Giese, H.Kretzschmar, B.Hengerer, M.Kostka, Different species of alpha-synuclein oligomers induce calcium influx and seeding, *J Neurosci.* 27 (2007) 9220-9232.
- [28] W. S. Davidson, A.Jonas, D.F.Clayton, J.M.George, Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes, *J Biol.Chem* 273 (1998) 9443-9449.
- [29] M. C. de Rijk, L.J.Launer, K.Berger, M.M.Breteler, J.F.Dartigues, M.Baldereschi, L.Fratiglioni, A.Lobo, J.Martinez-Lage, C.Trenkwalder, A.Hofman, Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group, *Neurology* 54 (2000) S21-S23.
- [30] M. C. de Rijk, W.A.Rocca, D.W.Anderson, M.O.Melcon, M.M.Breteler, D.M.Maraganore, A population perspective on diagnostic criteria for Parkinson's disease, *Neurology* 48 (1997) 1277-1281.
- [31] K. K. Dev, K.Hofele, S.Barbieri, V.L.Buchman, P.H.van Der, Part II: alpha-synuclein and its molecular pathophysiological role in neurodegenerative disease, *Neuropharmacology* 45 (2003) 14-44.
- [32] D. T. Dexter, F.R.Wells, A.J.Lees, F.Agid, Y.Agid, P.Jenner, C.D.Marsden, Increased nigral iron content and alterations in other metal ions occurring in brain in Parkinson's disease, *J.Neurochem.* 52 (1989) 1830-1836.
- [33] D. W. Dickson, D.Ruan, H.Crystal, M.H.Mark, P.Davies, Y.Kress, S.H.Yen, Hippocampal degeneration differentiates diffuse Lewy body disease (DLBD) from Alzheimer's disease: light and electron microscopic immunocytochemistry of CA2-3 neurites specific to DLBD, *Neurology* 41 (1991) 1402-1409.
- [34] T. T. Ding, S.J.Lee, J.C.Rochet, P.T.Lansbury, Jr., Annular alpha-synuclein protofibrils are produced when spherical protofibrils are incubated in solution or bound to brain-derived membranes, *Biochemistry* 41 (2002) 10209-10217.
- [35] W. Dowhan, M.Bogdanov and E.Mileykovskaya, (2008) *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes* (Vance,D.E. and Vance,J.E., Eds.), pp. 1-36 Elsevier.
- [36] M. Ehrenberg and R.Rigler, Rotational brownian motion and fluorescence intensity fluctuations, *Chem Phys* 4 (1974) 390-390.
- [37] M. Ehrenberg and R.Rigler, Fluorescence correlation spectroscopy applied to rotational diffusion of macromolecules, *Q.Rev.Biophys.* 9 (1976) 69-81.
- [38] M. Eigen and R.Rigler, Sorting single molecules: application to diagnostics and evolutionary biotechnology, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91 (1994) 5740-5747.

- [39] O. M. El Agnaf, K.E.Paleologou, B.Greer, A.M.Abogrein, J.E.King, S.A.Salem, N.J.Fullwood, F.E.Benson, R.Hewitt, K.J.Ford, F.L.Martin, P.Harriott, M.R.Cookson, D.Allsop, A strategy for designing inhibitors of alpha-synuclein aggregation and toxicity as a novel treatment for Parkinson's disease and related disorders, *FASEB J.* 18 (2004) 1315-1317.
- [40] O. M. El Agnaf, S.A.Salem, K.E.Paleologou, M.D.Curran, M.J.Gibson, Court JA, M.G.Schlossmacher, D.Allsop, Detection of oligomeric forms of alpha-synuclein protein in human plasma as a potential biomarker for Parkinson's disease, *FASEB J.* 20 (2006) 419-425.
- [41] K. El Kirat, I.Burton, V.Dupres, Y.F.Dufrene, Sample preparation procedures for biological atomic force microscopy, *J Microsc.* 218 (2005) 199-207.
- [42] S. Evers and M.Obladen, [Epidemiology and therapy of Parkinson disease in inpatient nursing homes], *Z.Gerontol.* 27 (1994) 270-275.
- [43] Evotec-Technologies Hamburg (2004) Confocal Fluorescence Data Analysis Technology FCS+plus Manual
- [44] J. M. Fearnley and A.J.Lees, Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity, *Brain* 114 (Pt 5) (1991) 2283-2301.
- [45] A. L. Fink, The aggregation and fibrillation of alpha-synuclein, *Acc.Chem.Res.* 39 (2006) 628-634.
- [46] M. S. Forman, V.M.Lee, J.Q.Trojanowski, Nosology of Parkinson's disease: looking for the way out of a quagmire, *Neuron* 47 (2005) 479-482.
- [47] L. S. Forno, Neuropathology of Parkinson's disease, *J Neuropathol.Exp.Neurol.* 55 (1996) 259-272.
- [48] A. Gaeta and R.C.Hider, The crucial role of metal ions in neurodegeneration: the basis for a promising therapeutic strategy, *Br.J.Pharmacol.* 146 (2005) 1041-1059.
- [49] T. Gasser, Overview of the genetics of parkinsonism, *Adv.Neurol.* 91 (2003) 143-152.
- [50] T. Gasser, Update on the genetics of Parkinson's disease, *Mov Disord.* 22 Suppl 17 (2007) S343-S350.
- [51] B. I. Giasson, I.V.Murray, J.Q.Trojanowski, V.M.Lee, A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of alpha-synuclein is essential for filament assembly, *J Biol.Chem* 276 (2001) 2380-2386.
- [52] A. Giese, B.Bader, J.Bieschke, G.Schaffar, S.Odoy, P.J.Kahle, C.Haass, H.Kretzschmar, Single particle detection and characterization of synuclein co-aggregation, *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 333 (2005) 1202-1210.
- [53] A. Giese, J.Bieschke, M.Eigen, H.A.Kretzschmar, Putting prions into focus: application of single molecule detection to the diagnosis of prion diseases, *Arch.Virol.Suppl* (2000) 161-171.

- [54] A. Giese, J. Levin, U. Bertsch, H. Kretzschmar, Effect of metal ions on de novo aggregation of full-length prion protein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320 (2004) 1240-1246.
- [55] C. G. Glabe, Common mechanisms of amyloid oligomer pathogenesis in degenerative disease, *Neurobiol. Aging* 27 (2006) 570-575.
- [56] C. G. Glabe, Structural classification of toxic amyloid oligomers, *J Biol. Chem* 283 (2008) 29639-29643.
- [57] C. G. Glabe and R. Kaye, Common structure and toxic function of amyloid oligomers implies a common mechanism of pathogenesis, *Neurology* 66 (2006) S74-S78.
- [58] M. Goedert, Filamentous nerve cell inclusions in neurodegenerative diseases: tauopathies and alpha-synucleinopathies, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 354 (1999) 1101-1118.
- [59] M. Goedert, Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases, *Nat. Rev. Neurosci.* 2 (2001) 492-501.
- [60] M. Goedert, Parkinson's disease and other alpha-synucleinopathies, *Clin. Chem. Lab Med.* 39 (2001) 308-312.
- [61] M. S. Goldberg and P. T. Lansbury, Jr., Is there a cause-and-effect relationship between alpha-synuclein fibrillization and Parkinson's disease?, *Nat. Cell Biol.* 2 (2000) E115-E119.
- [62] J. M. Gorell, C. C. Johnson, B. A. Rybicki, E. L. Peterson, G. X. Kortsha, G. G. Brown, R. J. Richardson, Occupational exposures to metals as risk factors for Parkinson's disease, *Neurology* 48 (1997) 650-658.
- [63] N. Gosavi, H. J. Lee, J. S. Lee, S. Patel, S. J. Lee, Golgi fragmentation occurs in the cells with prefibrillar alpha-synuclein aggregates and precedes the formation of fibrillar inclusion, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 48984-48992.
- [64] M. E. Gotz, K. Double, M. Gerlach, M. B. Youdim, P. Riederer, The relevance of iron in the pathogenesis of Parkinson's disease, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1012 (2004) 193-208.
- [65] C. Haass and D. J. Selkoe, Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 (2007) 101-112.
- [66] J. Hardy and D. J. Selkoe, The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics, *Science* 297 (2002) 353-356.
- [67] T. Hasegawa, M. Matsuzaki, A. Takeda, A. Kikuchi, H. Akita, G. Perry, M. A. Smith, Y. Itoyama, Accelerated alpha-synuclein aggregation after differentiation of SH-SY5Y neuroblastoma cells, *Brain Res.* 1013 (2004) 51-59.
- [68] M. Hashimoto, L. J. Hsu, E. Rockenstein, T. Takenouchi, M. Mallory, E. Masliah, alpha-Synuclein protects against oxidative stress via inactivation of the c-Jun N-terminal kinase stress-signaling pathway in neuronal cells, *J Biol. Chem* 277 (2002) 11465-11472.

- [69] E. Haustein and P.Schwille, Ultrasensitive investigations of biological systems by fluorescence correlation spectroscopy, *Methods* 29 (2003) 153-166.
- [70] S. C. Hinnah, K.Hill, R.Wagner, T.Schlicher, J.Soll, Reconstitution of a chloroplast protein import channel, *EMBO J* 16 (1997) 7351-7360.
- [71] W. Hoyer, T.Antony, D.Cherny, G.Heim, T.M.Jovin, V.Subramaniam, Dependence of alpha-synuclein aggregate morphology on solution conditions, *J.Mol.Biol.* 322 (2002) 383-393.
- [72] A. J. Hughes, S.E.Daniel, Y.Ben Shlomo, A.J.Lees, The accuracy of diagnosis of parkinsonian syndromes in a specialist movement disorder service, *Brain* 125 (2002) 861-870.
- [73] P. Ibanez, A.M.Bonnet, B.Debarges, E.Lohmann, F.Tison, P.Pollak, Y.Agid, A.Durr, A.Brice, Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease, *Lancet* 364 (2004) 1169-1171.
- [74] M. C. Irizarry, W.Growdon, T.Gomez-Isla, K.Newell, J.M.George, D.F.Clayton, B.T.Hyman, Nigral and cortical Lewy bodies and dystrophic nigral neurites in Parkinson's disease and cortical Lewy body disease contain alpha-synuclein immunoreactivity, *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 57 (1998) 334-337.
- [75] M. C. Irizarry, T.W.Kim, M.McNamara, R.E.Tanzi, J.M.George, D.F.Clayton, B.T.Hyman, Characterization of the precursor protein of the non-A beta component of senile plaques (NACP) in the human central nervous system, *J Neuropathol.Exp.Neurol.* 55 (1996) 889-895.
- [76] A. Iwai, E.Masliah, M.Yoshimoto, N.Ge, L.Flanagan, H.A.de Silva, A.Kittel, T.Saitoh, The precursor protein of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system, *Neuron* 14 (1995) 467-475.
- [77] R. Jakes, M.G.Spillantini, M.Goedert, Identification of two distinct synucleins from human brain, *FEBS Lett* 345 (1994) 27-32.
- [78] K. A. Jellinger, The neuropathologic diagnosis of secondary parkinsonian syndromes, *Adv.Neurol.* 69 (1996) 293-303.
- [79] K. A. Jellinger, Neuropathological spectrum of synucleinopathies, *Mov Disord.* 18 Suppl 6 (2003) S2-12.
- [80] J. M. Jenco, A.Rawlingson, B.Daniels, A.J.Morris, Regulation of phospholipase D2: selective inhibition of mammalian phospholipase D isoenzymes by alpha- and beta-synucleins, *Biochemistry* 37 (1998) 4901-4909.
- [81] P. H. Jensen, M.S.Nielsen, R.Jakes, C.G.Dotti, M.Goedert, Binding of alpha-synuclein to brain vesicles is abolished by familial Parkinson's disease mutation, *J Biol.Chem* 273 (1998) 26292-26294.
- [82] H. Ji, Y.E.Liu, T.Jia, M.Wang, J.Liu, G.Xiao, B.K.Joseph, C.Rosen, Y.E.Shi, Identification of a breast cancer-specific gene, BCSG1, by direct differential cDNA sequencing, *Cancer Res.* 57 (1997) 759-764.

- [83] P. J. Kahle, C.Haass, H.A.Kretzschmar, M.Neumann, Structure/function of alpha-synuclein in health and disease: rational development of animal models for Parkinson's and related diseases, *J Neurochem.* 82 (2002) 449-457.
- [84] P. J. Kahle, M.Neumann, L.Ozmen, V.Muller, H.Jacobsen, A.Schindzielorz, M.Okochi, U.Leimer, P.H.van Der, A.Probst, E.Kremmer, H.A.Kretzschmar, C.Haass, Subcellular localization of wild-type and Parkinson's disease-associated mutant alpha -synuclein in human and transgenic mouse brain, *J Neurosci.* 20 (2000) 6365-6373.
- [85] P. J. Kahle, M.Neumann, L.Ozmen, V.Muller, H.Jacobsen, W.Spooren, B.Fuss, B.Mallon, W.B.Macklin, H.Fujiwara, M.Hasegawa, T.Iwatsubo, H.A.Kretzschmar, C.Haass, Hyperphosphorylation and insolubility of alpha-synuclein in transgenic mouse oligodendrocytes, *EMBO Rep.* 3 (2002) 583-588.
- [86] P. J. Kahle, M.Neumann, L.Ozmen, V.Muller, S.Odoy, N.Okamoto, H.Jacobsen, T.Iwatsubo, J.Q.Trojanowski, H.Takahashi, K.Wakabayashi, N.Bogdanovic, P.Riederer, H.A.Kretzschmar, C.Haass, Selective insolubility of alpha-synuclein in human Lewy body diseases is recapitulated in a transgenic mouse model, *Am.J.Pathol.* 159 (2001) 2215-2225.
- [87] F. Kamp and K.Beyer, Binding of alpha-synuclein affects the lipid packing in bilayers of small vesicles, *J Biol.Chem* 281 (2006) 9251-9259.
- [88] P. Kask, K.Palo, N.Fay, L.Brand, U.Mets, D.Ullmann, J.Jungmann, J.Pschorr, K.Gall, Two-dimensional fluorescence intensity distribution analysis: theory and applications, *Biophys.J.* 78 (2000) 1703-1713.
- [89] P. Kask, K.Palo, D.Ullmann, K.Gall, Fluorescence-intensity distribution analysis and its application in biomolecular detection technology, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96 (1999) 13756-13761.
- [90] D. Kaur, J.Peng, S.J.Chinta, S.Rajagopalan, D.A.Di Monte, R.A.Cherny, J.K.Andersen, Increased murine neonatal iron intake results in Parkinson-like neurodegeneration with age, *Neurobiol.Aging* 28 (2007) 907-913.
- [91] D. Kaur, F.Yantiri, S.Rajagopalan, J.Kumar, J.Q.Mo, R.Boonplueang, V.Viswanath, R.Jacobs, L.Yang, M.F.Beal, D.DiMonte, I.Volitaskis, L.Ellerby, R.A.Cherny, A.I.Bush, J.K.Andersen, Genetic or pharmacological iron chelation prevents MPTP-induced neurotoxicity in vivo: a novel therapy for Parkinson's disease, *Neuron* 37 (2003) 899-909.
- [92] R. Kaye and C.G.Glabe, Conformation-dependent anti-amyloid oligomer antibodies, *Methods Enzymol.* 413 (2006) 326-344.
- [93] R. Kaye, E.Head, F.Sarsoza, T.Saing, C.W.Cotman, M.Necula, L.Margol, J.Wu, L.Breydo, J.L.Thompson, S.Rasool, T.Gurlo, P.Butler, C.G.Glabe, Fibril specific, conformation dependent antibodies recognize a generic epitope common to amyloid fibrils and fibrillar oligomers that is absent in prefibrillar oligomers, *Mol.Neurodegener.* 2 (2007) 1-11.

- [94] R. Kayed, E.Head, J.L.Thompson, T.M.McIntire, S.C.Milton, C.W.Cotman, C.G.Glabe, Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis, *Science* 300 (2003) 486-489.
- [95] R. Kayed, Y.Sokolov, B.Edmonds, T.M.McIntire, S.C.Milton, J.E.Hall, C.G.Glabe, Permeabilization of lipid bilayers is a common conformation-dependent activity of soluble amyloid oligomers in protein misfolding diseases, *J.Biol.Chem.* 279 (2004) 46363-46366.
- [96] I. I. Kessler, Parkinson's disease in epidemiologic perspective, *Adv.Neurol.* 19 (1978) 355-384.
- [97] H. Kokubo, R.Kayed, C.G.Glabe, H.Yamaguchi, Soluble Abeta oligomers ultrastructurally localize to cell processes and might be related to synaptic dysfunction in Alzheimer's disease brain, *Brain Res.* 1031 (2005) 222-228.
- [98] A. Koltermann, U.Kettling, J.Bieschke, T.Winkler, M.Eigen, Rapid assay processing by integration of dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy: high throughput screening for enzyme activity, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95 (1998) 1421-1426.
- [99] E. H. Koo, P.T.Lansbury, Jr., J.W.Kelly, Amyloid diseases: abnormal protein aggregation in neurodegeneration, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96 (1999) 9989-9990.
- [100] M. Kostka, T.Högen, K.M.Danzer, J.Levin, M.Habeck, A.Wirth, R.Wagner, C.G.Glabe, S.Finger, U.Heinzelmann, P.Garidel, W.Duan, C.A.Ross, H.Kretschmar, A.Giese, Single particle characterization of iron-induced pore-forming alpha-synuclein oligomers, *J Biol.Chem* 283 (2008) 10992-11003.
- [101] R. Krishnan and S.L.Lindquist, Structural insights into a yeast prion illuminate nucleation and strain diversity, *Nature* 435 (2005) 765-772.
- [102] R. Kruger, W.Kuhn, T.Muller, D.Woitalla, M.Graeber, S.Kosel, H.Przuntek, J.T.Eppelen, L.Schols, O.Riess, Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease, *Nat.Genet.* 18 (1998) 106-108.
- [103] J. Kyhse-Andersen, Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose, *J Biochem.Biophys Methods* 10 (1984) 203-209.
- [104] U. K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680-685.
- [105] A. E. Lang and A.M.Lozano, Parkinson's disease. First of two parts, *N.Engl.J Med.* 339 (1998) 1044-1053.
- [106] K. E. Larsen, Y.Schmitz, M.D.Troyer, E.Mosharov, P.Dietrich, A.Z.Quazi, M.Savalle, V.Nemani, F.A.Chaudhry, R.H.Edwards, L.Stefanis, D.Sulzer, Alpha-synuclein overexpression in PC12 and chromaffin cells impairs catecholamine release by interfering with a late step in exocytosis, *J Neurosci.* 26 (2006) 11915-11922.

- [107] H. A. Lashuel and P.T.Lansbury, Jr., Are amyloid diseases caused by protein aggregates that mimic bacterial pore-forming toxins?, *Q.Rev Biophys* 39 (2006) 167-201.
- [108] H. A. Lashuel, B.M.Petre, J.Wall, M.Simon, R.J.Nowak, T.Walz, P.T.Lansbury, Jr., Alpha-synuclein, especially the Parkinson's disease-associated mutants, forms pore-like annular and tubular protofibrils, *J.Mol.Biol.* 322 (2002) 1089-1102.
- [109] C. Lavedan, The synuclein family, *Genome Res.* 8 (1998) 871-880.
- [110] C. Lavedan, E.Leroy, A.Dehejia, S.Buchholtz, A.Dutra, R.L.Nussbaum, M.H.Polymeropoulos, Identification, localization and characterization of the human gamma-synuclein gene, *Hum.Genet.* 103 (1998) 106-112.
- [111] A. Lebeau, F.Esclaire, W.Rostene, D.Pelaprat, Baicalein protects cortical neurons from beta-amyloid (25-35) induced toxicity, *Neuroreport* 12 (2001) 2199-2202.
- [112] F. J. Lee, F.Liu, Z.B.Pristupa, H.B.Niznik, Direct binding and functional coupling of alpha-synuclein to the dopamine transporters accelerate dopamine-induced apoptosis, *FASEB J* 15 (2001) 916-926.
- [113] H. J. Lee, C.Choi, S.J.Lee, Membrane-bound alpha-synuclein has a high aggregation propensity and the ability to seed the aggregation of the cytosolic form, *J Biol.Chem* 277 (2002) 671-678.
- [114] M. K. Lee, W.Stirling, Y.Xu, X.Xu, D.Qui, A.S.Mandir, T.M.Dawson, N.G.Copeland, N.A.Jenkins, D.L.Price, Human alpha-synuclein-harboring familial Parkinson's disease-linked Ala-53 --> Thr mutation causes neurodegenerative disease with alpha-synuclein aggregation in transgenic mice, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 99 (2002) 8968-8973.
- [115] J. Levin, U.Bertsch, H.Kretzschmar, A.Giese, Single particle analysis of manganese-induced prion protein aggregates, *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 329 (2005) 1200-1207.
- [116] J. Levin, A.Giese, K.Boetzel, L.Israel, T.Högen, G.Nübling, H.Kretzschmar, S.Lorenzl, Increased alpha-synuclein aggregation following limited cleavage by certain matrix metalloproteinases, *Exp.Neurol.* (2008) in Press.
- [117] J. Li, M.Zhu, S.Rajamani, V.N.Uversky, A.L.Fink, Rifampicin inhibits alpha-synuclein fibrillation and disaggregates fibrils, *Chem Biol.* 11 (2004) 1513-1521.
- [118] E. Lindersson, R.Beedholm, P.Hojrup, T.Moos, W.Gai, K.B.Hendil, P.H.Jensen, Proteasomal inhibition by alpha-synuclein filaments and oligomers, *J.Biol.Chem* 279 (2004) 12924-12934.
- [119] S. Liu, I.Ninan, I.Antonova, F.Battaglia, F.Trinchese, A.Narasanna, N.Kolodilov, W.Dauer, R.D.Hawkins, O.Arancio, alpha-Synuclein produces a long-lasting increase in neurotransmitter release, *EMBO J* 23 (2004) 4506-4516.
- [120] J. Lowe, Establishing a pathological diagnosis in degenerative dementias, *Brain Pathol.* 8 (1998) 403-406.

- [121] V. Luibl, J.M.Isas, R.Kayed, C.G.Glabbe, R.Langen, J.Chen, Drusen deposits associated with aging and age-related macular degeneration contain nonfibrillar amyloid oligomers, *J.Clin.Invest.* 116 (2006) 378-385.
- [122] D. Magde, E.L.Elson, W.W.Webb, Thermodynamic fluctuations in a reacting system—measurement by fluorescence correlation spectroscopy, *Phys Rev Lett* 29 (1972) 705-711.
- [123] D. Magde, E.L.Elson, W.W.Webb, Fluorescence correlation spectroscopy. II. An experimental realization, *Biopolymers* 13 (1974) 29-61.
- [124] L. Maroteaux, J.T.Campanelli, R.H.Scheller, Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal, *J Neurosci.* 8 (1988) 2804-2815.
- [125] M. J. Marti, E.Tolosa, J.Campdelacreu, Clinical overview of the synucleinopathies, *Mov Disord.* 18 Suppl 6 (2003) S21-S27.
- [126] E. Masliah, A.Iwai, M.Mallory, K.Ueda, T.Saitoh, Altered presynaptic protein NACP is associated with plaque formation and neurodegeneration in Alzheimer's disease, *Am.J Pathol.* 148 (1996) 201-210.
- [127] P. J. McLean and B.T.Hyman, An alternatively spliced form of rodent alpha-synuclein forms intracellular inclusions in vitro: role of the carboxy-terminus in alpha-synuclein aggregation, *Neurosci.Lett* 323 (2002) 219-223.
- [128] P. J. McLean, H.Kawamata, S.Ribich, B.T.Hyman, Membrane association and protein conformation of alpha-synuclein in intact neurons. Effect of Parkinson's disease-linked mutations, *J Biol.Chem* 275 (2000) 8812-8816.
- [129] U. Meseth, T.Wohland, R.Rigler, H.Vogel, Resolution of fluorescence correlation measurements, *Biophys J* 76 (1999) 1619-1631.
- [130] D. Meuser, H.Splitt, R.Wagner, H.Schrempf, Exploring the open pore of the potassium channel from *Streptomyces lividans*, *FEBS Lett.* 462 (1999) 447-452.
- [131] S. Michaeli, G.Oz, D.J.Sorce, M.Garwood, K.Ugurbil, S.Majestic, P.Tuite, Assessment of brain iron and neuronal integrity in patients with Parkinson's disease using novel MRI contrasts, *Mov Disord.* 22 (2007) 334-340.
- [132] Y. Mizuno, N.Hattori, S.Kubo, S.Sato, K.Nishioka, T.Hatano, H.Tomiyama, M.Funayama, Y.Machida, H.Mochizuki, Progress in the pathogenesis and genetics of Parkinson's disease, *Philos.Trans.R.Soc.Lond.B.Biol.Sci.* 363 (2008) 2215-2227.
- [133] P. J. Muchowski, Protein misfolding, amyloid formation, and neurodegeneration: a critical role for molecular chaperones?, *Neuron* 35 (2002) 9-12.
- [134] P. Mueller, D.O.Rudin, H.Tien, W.C.Wescott, Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system, *Nature* 194 (1962) 979-980.

- [135] L. A. Munishkina, J.Henriques, V.N.Uversky, A.L.Fink, Role of protein-water interactions and electrostatics in alpha-synuclein fibril formation, *Biochemistry* 43 (2004) 3289-3300.
- [136] L. A. Munishkina, C.Phelan, V.N.Uversky, A.L.Fink, Conformational behavior and aggregation of alpha-synuclein in organic solvents: modeling the effects of membranes, *Biochemistry* 42 (2003) 2720-2730.
- [137] D. D. Murphy, S.M.Rueter, J.Q.Trojanowski, V.M.Lee, Synucleins are developmentally expressed, and alpha-synuclein regulates the size of the presynaptic vesicular pool in primary hippocampal neurons, *J Neurosci.* 20 (2000) 3214-3220.
- [138] S. Nakajo, S.Shioda, Y.Nakai, K.Nakaya, Localization of phosphoneuroprotein 14 (PNP 14) and its mRNA expression in rat brain determined by immunocytochemistry and in situ hybridization, *Brain Res.Mol.Brain Res.* 27 (1994) 81-86.
- [139] W. D. Niles and F.S.Cohen, Video fluorescence microscopy studies of phospholipid vesicle fusion with a planar phospholipid membrane. Nature of membrane-membrane interactions and detection of release of contents, *J Gen.Physiol* 90 (1987) 703-735.
- [140] M. Nishie, F.Mori, M.Yoshimoto, H.Takahashi, K.Wakabayashi, A quantitative investigation of neuronal cytoplasmic and intranuclear inclusions in the pontine and inferior olivary nuclei in multiple system atrophy, *Neuropathol.Appl.Neurobiol.* 30 (2004) 546-554.
- [141] B. Nuscher, F.Kamp, T.Mehnert, S.Odoy, C.Haass, P.J.Kahle, K.Beyer, Alpha-synuclein has a high affinity for packing defects in a bilayer membrane: a thermodynamics study, *J.Biol.Chem.* 279 (2004) 21966-21975.
- [142] A. E. Oakley, J.F.Collingwood, J.Dobson, G.Love, H.R.Perrott, J.A.Edwardson, M.Elstner, C.M.Morris, Individual dopaminergic neurons show raised iron levels in Parkinson disease, *Neurology* 68 (2007) 1820-1825.
- [143] T. Obata, Effect of desferrioxamine, a strong iron (III) chelator, on 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺)-induced hydroxyl radical generation in the rat striatum, *Eur J.Pharmacol.* 539 (2006) 34-38.
- [144] M. Okochi, J.Walter, A.Koyama, S.Nakajo, M.Baba, T.Iwatsubo, L.Meijer, P.J.Kahle, C.Haass, Constitutive phosphorylation of the Parkinson's disease associated alpha-synuclein, *J Biol.Chem* 275 (2000) 390-397.
- [145] N. Ostrerova, L.Petrucci, M.Farrer, N.Mehta, P.Choi, J.Hardy, B.Wolozin, alpha-Synuclein shares physical and functional homology with 14-3-3 proteins, *J Neurosci.* 19 (1999) 5782-5791.
- [146] N. Ostrerova-Golts, L.Petrucci, J.Hardy, J.M.Lee, M.Farer, B.Wolozin, The A53T alpha-synuclein mutation increases iron-dependent aggregation and toxicity, *J.Neurosci.* 20 (2000) 6048-6054.

- [147] T. F. Outeiro, P. Putcha, J.E. Tetzlaff, R. Spoelgen, M. Koker, F. Carvalho, B.T. Hyman, P.J. McLean, Formation of toxic oligomeric alpha-synuclein species in living cells, *PLoS ONE*. 3 (2008) e1867-e1867.
- [148] S. R. Paik, H.J. Shin, J.H. Lee, C.S. Chang, J. Kim, Copper(II)-induced self-oligomerization of alpha-synuclein, *Biochem. J.* 340 (Pt 3) (1999) 821-828.
- [149] N. Pandey, J. Strider, W.C. Nolan, S.X. Yan, J.E. Galvin, Curcumin inhibits aggregation of alpha-synuclein, *Acta Neuropathol.* 115 (2008) 479-489.
- [150] M. I. Papp, J.E. Kahn, P.L. Lantos, Glial cytoplasmic inclusions in the CNS of patients with multiple system atrophy (striatonigral degeneration, olivopontocerebellar atrophy and Shy-Drager syndrome), *J Neurol. Sci.* 94 (1989) 79-100.
- [151] J. Y. Park and P.T. Lansbury, Jr., Beta-synuclein inhibits formation of alpha-synuclein protofibrils: a possible therapeutic strategy against Parkinson's disease, *Biochemistry* 42 (2003) 3696-3700.
- [152] J. Parkinson, An essay on the shaking palsy. 1817, *J Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 14 (2002) 223-236.
- [153] J. T. Pelton and L.R. McLean, Spectroscopic methods for analysis of protein secondary structure, *Anal. Biochem.* 277 (2000) 167-176.
- [154] N. Piening, P. Weber, T. Högen, M. Beekes, H. Kretzschmar, A. Giese, Photo-induced crosslinking of prion protein oligomers and prions, *Amyloid*. 13 (2006) 67-77.
- [155] M. S. Pollanen, D.W. Dickson, C. Bergeron, Pathology and biology of the Lewy body, *J Neuropathol. Exp. Neurol.* 52 (1993) 183-191.
- [156] M. H. Polymeropoulos, C. Lavedan, E. Leroy, S.E. Ide, A. Dehejia, A. Dutra, B. Pike, H. Root, J. Rubenstein, R. Boyer, E.S. Stenroos, S. Chandrasekharappa, A. Athanassiadou, T. Papapetropoulos, W.G. Johnson, A.M. Lazzarini, R.C. Duvoisin, G. Di Iorio, L.I. Golbe, R.L. Nussbaum, Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease, *Science* 276 (1997) 2045-2047.
- [157] D. L. Pountney, R. Lowe, M. Quilty, J.C. Vickers, N.H. Voelcker, W.P. Gai, Annular alpha-synuclein species from purified multiple system atrophy inclusions, *J. Neurochem.* 90 (2004) 502-512.
- [158] A. N. Pronin, A.J. Morris, A. Surguchov, J.L. Benovic, Synucleins are a novel class of substrates for G protein-coupled receptor kinases, *J Biol. Chem* 275 (2000) 26515-26522.
- [159] A. Quist, I. Doudevski, H. Lin, R. Azimova, D. Ng, B. Frangione, B. Kagan, J. Ghiso, R. Lal, Amyloid ion channels: a common structural link for protein-misfolding disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (2005) 10427-10432.
- [160] A. H. Rajput, Environmental causation of Parkinson's disease, *Arch. Neurol.* 50 (1993) 651-652.

- [161] A. Recchia, P. Debetto, A. Negro, D. Guidolin, S. D. Skaper, P. Giusti, Alpha-synuclein and Parkinson's disease, *FASEB J* 18 (2004) 617-626.
- [162] S. L. Rhodes and B. Ritz, Genetics of iron regulation and the possible role of iron in Parkinson's disease, *Neurobiol. Dis.* 32 (2008) 183-195.
- [163] P. Riederer, E. Sofic, W. D. Rausch, B. Schmidt, G. P. Reynolds, K. Jellinger, M. B. Youdim, Transition metals, ferritin, glutathione, and ascorbic acid in parkinsonian brains, *J. Neurochem.* 52 (1989) 515-520.
- [164] R. Rigler, Fluorescence correlations, single molecule detection and large number screening. Applications in biotechnology, *J. Biotechnol.* 41 (1995) 177-186.
- [165] W. Romer and C. Steinem, Impedance analysis and single-channel recordings on nano-black lipid membranes based on porous alumina, *Biophys. J.* 86 (2004) 955-965.
- [166] C. A. Ross and M. A. Poirier, Protein aggregation and neurodegenerative disease, *Nat. Med.* 10 Suppl (2004) S10-S17.
- [167] A. Sanbe, H. Osinska, J. E. Saffitz, C. G. Glabe, R. Kaye, A. Maloyan, J. Robbins, Desmin-related cardiomyopathy in transgenic mice: a cardiac amyloidosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (2004) 10132-10136.
- [168] I. Sanchez, C. Mahlke, J. Yuan, Pivotal role of oligomerization in expanded polyglutamine neurodegenerative disorders, *Nature* 421 (2003) 373-379.
- [169] N. W. Schiffer, S. A. Broadley, T. Hirschberger, P. Tavan, H. A. Kretzschmar, A. Giese, C. Haass, F. U. Hartl, B. Schmid, Identification of anti-prion compounds as efficient inhibitors of polyglutamine protein aggregation in a zebrafish model, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 9195-9203.
- [170] J. Schwarz and A. Storch, (2007) *Parkinson-Syndrome*, Kohlhammer, Stuttgart, Germany.
- [171] P. Schwille, J. Bieschke, F. Oehlenschläger, Kinetic investigations by fluorescence correlation spectroscopy: the analytical and diagnostic potential of diffusion studies, *Biophys. Chem* 66 (1997) 211-228.
- [172] P. Schwille, F. J. Meyer-Almes, R. Rigler, Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy for multicomponent diffusional analysis in solution, *Biophys. J.* 72 (1997) 1878-1886.
- [173] L. C. Serpell, J. Berriman, R. Jakes, M. Goedert, R. A. Crowther, Fiber diffraction of synthetic alpha-synuclein filaments shows amyloid-like cross-beta conformation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97 (2000) 4897-4902.
- [174] D. B. Shachar, N. Kahana, V. Kampel, A. Warshawsky, M. B. Youdim, Neuroprotection by a novel brain permeable iron chelator, VK-28, against 6-hydroxydopamine lesion in rats, *Neuropharmacology* 46 (2004) 254-263.

- [175] R. Sharon, I.Bar-Joseph, M.P.Frosch, D.M.Walsh, J.A.Hamilton, D.J.Selkoe, The formation of highly soluble oligomers of alpha-synuclein is regulated by fatty acids and enhanced in Parkinson's disease, *Neuron* 37 (2003) 583-595.
- [176] A. B. Singleton, M.Farrer, J.Johnson, A.Singleton, S.Hague, J.Kachergus, M.Hulihan, T.Peuralinna, A.Dutra, R.Nussbaum, S.Lincoln, A.Crawley, M.Hanson, D.Maraganore, C.Adler, M.R.Cookson, M.Muenter, M.Baptista, D.Miller, J.Blancato, J.Hardy, K.Gwinn-Hardy, Alpha-synuclein locus triplication causes Parkinson's disease, *Science* 302 (2003) 841-841.
- [177] E. Sofic, P.Riederer, H.Heinsen, H.Beckmann, G.P.Reynolds, G.Hebenstreit, M.B.Youdim, Increased iron (III) and total iron content in post mortem substantia nigra of parkinsonian brain, *J.Neural Transm.* 74 (1988) 199-205.
- [178] C. Soto, Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases, *Nat.Rev.Neurosci.* 4 (2003) 49-60.
- [179] M. G. Spillantini, R.A.Crowther, R.Jakes, N.J.Cairns, P.L.Lantos, M.Goedert, Filamentous alpha-synuclein inclusions link multiple system atrophy with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies, *Neurosci.Lett.* 251 (1998) 205-208.
- [180] M. G. Spillantini, A.Divane, M.Goedert, Assignment of human alpha-synuclein (SNCA) and beta-synuclein (SNCB) genes to chromosomes 4q21 and 5q35, *Genomics* 27 (1995) 379-381.
- [181] M. G. Spillantini and M.Goedert, The alpha-synucleinopathies: Parkinson's disease, dementia with Lewy bodies, and multiple system atrophy, *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 920 (2000) 16-27.
- [182] M. G. Spillantini, M.L.Schmidt, V.M.Lee, J.Q.Trojanowski, R.Jakes, M.Goedert, Alpha-synuclein in Lewy bodies, *Nature* 388 (1997) 839-840.
- [183] A. Surguchov, I.Surgucheva, E.Solessio, W.Baehr, Synoretin--A new protein belonging to the synuclein family, *Mol.Cell Neurosci.* 13 (1999) 95-103.
- [184] A. Takeda, M.Hashimoto, M.Mallory, M.Sundsumo, L.Hansen, A.Sisk, E.Maslah, Abnormal distribution of the non-Abeta component of Alzheimer's disease amyloid precursor/alpha-synuclein in Lewy body disease as revealed by proteinase K and formic acid pretreatment, *Lab Invest* 78 (1998) 1169-1177.
- [185] Y. Tanaka, S.Engelender, S.Igarashi, R.K.Rao, T.Wanner, R.E.Tanzi, A.Sawa, L.Dawson, T.M.Dawson, C.A.Ross, Inducible expression of mutant alpha-synuclein decreases proteasome activity and increases sensitivity to mitochondria-dependent apoptosis, *Hum.Mol.Genet.* 10 (2001) 919-926.
- [186] G. K. Tofaris, T.Revesz, T.S.Jacques, S.Papacostas, J.Chataway, Adult-onset neurodegeneration with brain iron accumulation and cortical alpha-synuclein and tau pathology: a distinct clinicopathological entity, *Arch.Neurol.* 64 (2007) 280-282.
- [187] G. K. Tofaris and M.G.Spillantini, Alpha-synuclein dysfunction in Lewy body diseases, *Mov Disord.* 20 Suppl 12 (2005) S37-S44.

- [188] H. Towbin, T.Staehelin, J.Gordon, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 76 (1979) 4350-4354.
- [189] J. Q. Trojanowski and V.M.Lee, Parkinson's disease and related alpha-synucleinopathies are brain amyloidoses, *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 991 (2003) 107-110.
- [190] K. Ueda, H.Fukushima, E.Maslah, Y.Xia, A.Iwai, M.Yoshimoto, D.A.Otero, J.Kondo, Y.Ihara, T.Saitoh, Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90 (1993) 11282-11286.
- [191] V. N. Uversky, Neuropathology, biochemistry, and biophysics of alpha-synuclein aggregation, *J Neurochem.* 103 (2007) 17-37.
- [192] V. N. Uversky, J.Li, A.L.Fink, Evidence for a partially folded intermediate in alpha-synuclein fibril formation, *J.Biol.Chem.* 276 (2001) 10737-10744.
- [193] V. N. Uversky, J.Li, A.L.Fink, Metal-triggered structural transformations, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. A possible molecular link between Parkinson's disease and heavy metal exposure, *J.Biol.Chem.* 276 (2001) 44284-44296.
- [194] V. N. Uversky, J.Li, P.Souillac, I.S.Millett, S.Doniach, R.Jakes, M.Goedert, A.L.Fink, Biophysical properties of the synucleins and their propensities to fibrillate: inhibition of alpha-synuclein assembly by beta- and gamma-synucleins, *J Biol.Chem* 277 (2002) 11970-11978.
- [195] V. N. Uversky, G.Yamin, L.A.Munishkina, M.A.Karymov, I.S.Millett, S.Doniach, Y.L.Lyubchenko, A.L.Fink, Effects of nitration on the structure and aggregation of alpha-synuclein, *Brain Res.Mol.Brain Res.* 134 (2005) 84-102.
- [196] M. J. Volles and P.T.Lansbury, Jr., Vesicle permeabilization by protofibrillar alpha-synuclein is sensitive to Parkinson's disease-linked mutations and occurs by a pore-like mechanism, *Biochemistry* 41 (2002) 4595-4602.
- [197] M. J. Volles, S.J.Lee, J.C.Rochet, M.D.Shtilerman, T.T.Ding, J.C.Kessler, P.T.Lansbury, Jr., Vesicle permeabilization by protofibrillar alpha-synuclein: implications for the pathogenesis and treatment of Parkinson's disease, *Biochemistry* 40 (2001) 7812-7819.
- [198] S. von Campenhausen, B.Bornschein, R.Wick, K.Botzel, C.Sampaio, W.Poewe, W.Oertel, U.Siebert, K.Berger, R.Dodel, Prevalence and incidence of Parkinson's disease in Europe, *Eur Neuropsychopharmacol.* 15 (2005) 473-490.
- [199] T. Winkler, U.Kettling, A.Koltermann, M.Eigen, Confocal fluorescence coincidence analysis: an approach to ultra high-throughput screening, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96 (1999) 1375-1378.
- [200] K. F. Winklhofer, J.Tatzelt, C.Haass, The two faces of protein misfolding: gain- and loss-of-function in neurodegenerative diseases, *EMBO J* 27 (2008) 336-349.

- [201] S. J. Wood, J.Wypych, S.Steavenson, J.C.Louis, M.Citron, A.L.Biere, alpha-synuclein fibrillogenesis is nucleation-dependent. Implications for the pathogenesis of Parkinson's disease, *J.Biol.Chem.* 274 (1999) 19509-19512.
- [202] D. J. Woodbury and J.E.Hall, Role of channels in the fusion of vesicles with a planar bilayer, *Biophys J* 54 (1988) 1053-1063.
- [203] L. Yavich, H.Tanila, S.Vepsalainen, P.Jakala, Role of alpha-synuclein in presynaptic dopamine recruitment, *J Neurosci.* 24 (2004) 11165-11170.
- [204] Y. Yoshiike, R.Kayed, S.C.Milton, A.Takashima, C.G.Glabe, Pore-forming proteins share structural and functional homology with amyloid oligomers, *Neuromolecular.Med.* 9 (2007) 270-275.
- [205] M. B. Youdim, G.Stephenson, D.Ben Shachar, Ironing iron out in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases with iron chelators: a lesson from 6-hydroxydopamine and iron chelators, desferal and VK-28, *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1012 (2004) 306-325.
- [206] S. D. Zakharov, J.D.Hulleman, E.A.Dutseva, Y.N.Antonenko, J.C.Rochet, W.A.Cramer, Helical alpha-synuclein forms highly conductive ion channels, *Biochemistry* 46 (2007) 14369-14379.
- [207] J. J. Zarranz, J.Alegre, J.C.Gomez-Esteban, E.Lezcano, R.Ros, I.Ampuero, L.Vidal, J.Hoenicka, O.Rodriguez, B.Atares, V.Llorens, T.E.Gomez, T.del Ser, D.G.Munoz, J.G.de Yebenes, The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia, *Ann.Neurol.* 55 (2004) 164-173.
- [208] J. Zayed, S.Ducic, G.Campanella, J.C.Panisset, P.Andre, H.Masson, M.Roy, [Environmental factors in the etiology of Parkinson's disease], *Can.J.Neurol.Sci.* 17 (1990) 286-291.
- [209] L. Zecca, M.B.Youdim, P.Riederer, J.R.Connor, R.R.Crichton, Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders, *Nat.Rev.Neurosci.* 5 (2004) 863-873.
- [210] X. Zhang, W.Xie, S.Qu, T.Pan, X.Wang, W.Le, Neuroprotection by iron chelator against proteasome inhibitor-induced nigral degeneration, *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 333 (2005) 544-549.
- [211] M. Zhu, Z.J.Qin, D.Hu, L.A.Munishkina, A.L.Fink, Alpha-synuclein can function as an antioxidant preventing oxidation of unsaturated lipid in vesicles, *Biochemistry* 45 (2006) 8135-8142.
- [212] M. Zhu, S.Rajamani, J.Kaylor, S.Han, F.Zhou, A.L.Fink, The flavonoid baicalein inhibits fibrillation of alpha-synuclein and disaggregates existing fibrils, *J.Biol.Chem.* 279 (2004) 26846-26857.
- [213] J. Zimmerberg, F.S.Cohen, A.Finkelstein, Micromolar Ca²⁺ stimulates fusion of lipid vesicles with planar bilayers containing a calcium-binding protein, *Science* 210 (1980) 906-908.

10. Lebenslauf

<u>Name:</u>	Tobias Johannes Högen
<u>Adresse:</u>	Stahleckplatz 11, 81375 München
<u>Geburtstag und –ort:</u>	13.09.1979, München
<u>Staatsangehörigkeit:</u>	deutsch
<u>Ausbildung/Beruf:</u>	
1999	Allgemeine Hochschulreife (Note 1,5)
1999-2000	Grundwehrdienst im Generalstab des 1.FüUstRgt 60 München
2000-2007	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) zu München
4/2006 – 4/2007	Praktisches Jahr: Innere Medizin Harvard Medical School (Massachusetts General Hospital, Mount Auburn Hospital), Boston, Massachusetts, USA Neurologie Neurologische Klinik, Klinikum Großhadern, LMU München Chirurgie Chirurgische Klinik, Klinikum Großhadern, LMU München
5/2007	Abschluss des Medizinstudiums (Gesamtnote 1,33)
7/2007 – 10/2008	Assistenzarzt am Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung (ZNP) der LMU München
seit 10/2008	Assistenzarzt an der Neurologischen Klinik und Poliklinik, Klinikum Großhadern der LMU München
<u>Dissertation/Wissenschaft:</u>	
2004 - 2008	Experimentelle Doktorarbeit am ZNP der LMU auf dem Gebiet der molekularen Grundlagenforschung des Morbus Parkinson. Dissertationsthema: „Einzelmolekülanalyse von eiseninduzierten, porenbildenden α -Synucleinoligomeren: Von der molekularen Pathologie zur kausalen Therapie“.
seit 7/2007	Aktueller Forschungsschwerpunkt: Interaktionsanalyse oligomerer α -Synucleinaggregate mit Lipidmembranen, Zellorganellen und neuronalen Zellen auf Einzelmolekül- und Einzelzellebene. Analyse metallionenabhängiger Aggregationsprozesse des α -Synucleins auf Einzelmolekülebene und Entwicklung potentieller therapeutischer Strategien. Aktivierung und Regulation des Inflammasom-Proteinkomplexes im Rahmen der bakteriellen Meningitis.

Stipendium:

Stipendium der München-Harvard-Allianz der LMU für das Tertial in Innerer Medizin an der Harvard Medical School (Boston, Massachusetts, USA) im Rahmen des Praktischen Jahres (2006)

Praktika:

1998 Physiologisches Praktikum an der School of Medicine in Carbondale, Illinois (USA)

2003 Praktikum für Molekulare Medizin am Max-von-Pettenkofer-Institut, LMU

2003-2007 Famulaturen:
Chirurgie – Berufsgenossenschaftliche Unfallklinik in Murnau
Pädiatrie – Otto Heubner Zentrum der Charité zu Berlin
Pädiatrie – Northern Virginia Pediatric Associates und Virginia Medical Center (Lehrkrankenhaus der Georgetown University Washington D.C.) in Arlington, Virginia (USA)
Neuropathologie – ZNP der LMU

Assistenz in der universitären Lehre:

seit 09/2004 Tutorentrainer und Tutor für funktionelle Neuroanatomie beim jährlichen „Intensivkurs-Neuroanatomie“ für Ärzte und Psychologen, Organisator: Prof. Dr. A. Danek, Dr. P. Reilich Neurologische Klinik Großhadern, LMU

seit WS 2004/2005 Tutor für funktionelle Neuroanatomie beim internationalen Elitestudiengang „Neurokognitive Psychologie (NCP)“ des Elitenetzwerkes Bayern

SS 2007 – SS 2008 Neuropathologische Lehrtätigkeit im Rahmen von Modul 1 (Makroskopische Demonstrationen und histologischer Kurs)

seit WS 2008 Neurologische Lehrtätigkeit im Rahmen von Modul IV

Ehrenamtliche Tätigkeiten:

2002-2007 Soziales Engagement in der Fachschaft Medizin der LMU

seit 2003 „Teddydoktor“ der Teddy-Ärzte München e.V.

seit 7/ 2008 Mentor an der Medizinischen Fakultät der LMU München im Rahmen des 2008 neu gegründeten Mentoring-Programms

Sprachkenntnisse:

Englisch (verhandlungssicher)
Französisch und Spanisch (Grundkurs)
Latinum

Interessen:

Musik (Trompete), Sport (Fußball, Tanzen, Klettern)

Publikationen:

Photo-induced crosslinking of prion protein oligomers and prions

Niklas Piening, Petra Weber, **Tobias Högen**, Michael Beekes, Hans Kretzschmar, Armin Giese

Amyloid. 2006. 13(2):67-77.

Single-particle characterization of iron-induced pore-forming α -synuclein oligomers

Marcus Kostka*, **Tobias Högen***, Karin Danzer*, Johannes Levin, Matthias Habeck, Andreas Wirth, Richard Wagner, Charles Glabe, Sabine Finger, Udo Heinzelmann, Patrick Garidel, Wenzhen Duan, Christopher Ross, Hans Kretzschmar, Armin Giese

Journal of Biological Chemistry. 2008. 283(16):10992-1003.

* contributed equally

Increased α -synuclein aggregation following limited cleavage by certain matrix metalloproteases

Johannes Levin, Armin Giese, Kai Boetzel, Lars Israel, **Tobias Högen**, Georg Nübling, Hans Kretzschmar and Stefan Lorenzl

Journal of Experimental Neurology. 2009. 215(1):201-208.

Patente:

WO 2005/116640 (Patenterteilung am 08.10.2008):

Systematic identification of antiprion drugs by high-throughput screening based on scanning for intensely fluorescent targets

Uwe Bertsch, Armin Giese, Hans Kretzschmar, Paul Tavan, Thomas Hirschberger, Jan Bieschke, Petra Weber, Konstanze F. Winklhofer, Jörg Tatzelt, F. Ulrich Hartl, Gerda Mitteregger, **Tobias Högen**

Präsentationen:

Single particle analysis of prions and protein aggregation

Armin Giese, **Tobias Högen**, Uwe Bertsch, Konstanze F. Winklhofer, Thomas Hirschberger, Jan Bieschke, Petra Weber, F. Ulrich Hartl, Paul Tavan, Jörg Tatzelt, Marcus Kostka, Hans Kretzschmar

The 5th Eibsee-Meeting on Cellular Mechanisms of Alzheimer`s Disease

Hotel am Eibsee, 17.-20.04.2005

What is the toxic species in Parkinson`s disease? Single particle analysis of α -synuclein oligomers

Tobias Högen, Marcus Kostka, Karin Danzer, Patrik Garidel, Udo Heinzelmann, Andreas Wirth, Hans Kretzschmar, Armin Giese

Neurodegenerative Diseases: Molecular Mechanism in a Functional Genomics Framework
Max-Delbrück-Center for Molecular Medicine (MDC), Berlin-Buch, 06.-09.09.2006

Neuropathological diagnosis of neurodegenerative and dementing disorders – a challenge for establishing an international brain bank network

Tobias Högen, Manuela Neumann, Armin Giese, Thomas Arzberger, Hans Kretzschmar
Rendez-vous Bavière-Québec en neurosciences 2008 der Bayerische Forschungsallianz,
Programm Bayern-Québec der Bayrischen Staatskanzlei, Frauenchiemsee, 25.-29.06.2008

Properties of iron-induced alpha-synuclein oligomers determined on a single particle level

Johannes Levin, **Tobias Högen**, Kai Bötzel, Marcus Kostka, Hans Kretzschmar, Armin Giese
Kongresses der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN), Hamburg, 10.-13.09.2008

Neuropathologische Demonstrationen – Von der Makroskopie zur Mikroskopie

Tobias Högen, Armin Giese

Intensivkurs Neuroanatomie, München, 02.-04.10.2008

Histopathologische Demonstrationen - Von der Makroskopie zur Mikroskopie

Tobias Högen, Armin Giese

53. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Klinische Neurophysiologie und Funktionelle Bildgebung mit Richard-Jung-Kolleg, München, Deutschland 26.-28.03.2009

Poster:

α -Synuclein oligomers – the toxic species in Parkinson`s disease

Karin Danzer, Sabine Finger, Udo Heinzelmann, Andreas Wirth, **Tobias Högen**, Armin Giese, Kostka Marcus

5th Forum of European Neuroscience, Wien, 08.-12.07.2006

α -Synuclein oligomers – the toxic species in Parkinson`s disease

Karin Danzer, Patrik Garidel, Udo Heinzelmann, Andreas Wirth, Erene Miina, **Tobias Högen**, Armin Giese, Marcus Kostka

The 10th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, Kyoto, Japan, 28.10.-02.12.2006.

Single-particle characterization of iron-induced pore-forming α -synuclein oligomers

Tobias Högen, Johannes Levin, Frits Kamp, Karin Danzer, Marcus Kostka, Andreas Wirth, Hans Kretzschmar, Armin Giese

9th European Congress of Neuropathology, Athen, Griechenland, 08.-10.05.2008

Synaptic and neuritic toxicity of α -synuclein oligomeres

Sandra Paluch, **Tobias Högen**, Karin M. Danzer, Johannes Levin, Bastian Hengerer, Armin Giese, Hans Kretzschmar, Jochen Herms

Neuroscience 2008, 38th annual meeting of the Society for Neuroscience, Washington D.C., USA, 15.-19.11.2008

Small molecule α -synuclein aggregation inhibitors: characterization by single molecule fluorescence in vitro and protein complementation assay in cell culture.

Andreas Hillmer, Preeti Putcha, Johannes Levin, **Tobias Högen**, Pamela McLean, Armin Giese

6. Deutscher Parkinsonkongress, Marburg, 05.-07.03.2009

Publizierte Abstracts:

α -Synuclein oligomeric forms – the toxic species in Parkinson`s disease

Marcus Kostka, Karin Ruf, Patrik Garidel, Udo Heinzelmann, Andreas Wirth, **Tobias Högen**, Hans Kretzschmar, Armin Giese

Movement Disorders. 2006 Sept; 21(S15):S586

Single-particle characterization of iron-induced pore-forming α -synuclein oligomers

Tobias Högen, Johannes Levin, Frits Kamp, Karin Danzer, Marcus Kostka, Andreas Wirth, Hans Kretzschmar, Armin Giese

Clinical Neuropathology 2008 May/Jun;27(3):175

11. Danksagung

Der größte Dank gebührt meinem Betreuer und Mentor Herrn Professor Dr. med. Armin Giese vom ZNP der LMU München. Seine Motivation, Aufmerksamkeit, Denkweise, Cleverness, Ruhe, Offenheit und Weitsicht sowohl für wissenschaftliche und medizinische Fragestellungen als auch für zwischenmenschliche Belange waren die Basis für die äußerst erfolgreiche Zusammenarbeit in den letzten Jahren. Als Kapitän des Parkinsonforschungsteams, dem zu Beginn nur wir beide angehörten und das inzwischen gewaltig angewachsen ist, eröffnete er mir mit seiner Begeisterungsfähigkeit und seinem positiven Denken das Verständnis, die Technik(en), die Taktik und die Faszination für die medizinische Grundlagenforschung. Mit viel Einsatz, Willenskraft und ausführlichen, teils nächtlichen, teils wochenendlichen Diskussionen und Analysen auf dem S2-Spielfeld oder auch der Tribüne der Arena haben wir es geschafft, das ZNP in der molekularen Parkinsonliga weiter zu etablieren.

Herrn Professor Dr. med. Dr. h.c. Hans Kretzschmar, Direktor des ZNP, danke ich sowohl für die nicht selbstverständliche forschungsbezogene Freiheit unseres Teams als auch für die wissenschaftliche und akademische Unterstützung in den letzten Jahren.

Innerhalb des Parkinsonteam danke ich ganz besonders Herrn Dr. med. Johannes Levin, der als „Driving Force“ mit seinem experimentellen „Fore-Checking“ einen großen Anteil zur Weiterentwicklung unseres wissenschaftlichen Ansatzes und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Ein herzlicher Dank gebührt unserem singenden Holländer Dr. rer.nat Frits Kamp für den „fetten“ Sturmloch, den wir seit seiner Verpflichtung einleiten konnten.

Unseren jungen, rockenden, scharf schießenden und urbayrischen Neuzugängen Andreas Hillmer, Georg Nübling und Felix Schmidt danke ich für die 100%ige Kameradschaft und die Unterstützung im wissenschaftlichen Fünf-Meter-Raum 213.

Für das Training im Laboralltag sowie für die wissenschaftliche Zusammenarbeit danke ich nicht zuletzt Herrn Dr. rer. nat. Marcus Kostka, Frau Dr. rer. nat. Kathrin Dittmar, Herrn Dr. rer. nat. Niklas Piening, Herrn Dr. rer. nat. Alexander Hepp, Frau Janina Mielke, Frau Brigitte Kraft, Herrn Michael Schmidt, Frau Sabine Finger, Frau Dr. rer. nat. Karin Danzer, Herrn Dr. med. Matthias Habeck, Herrn Salah Solimann und Herrn Dr. rer. nat. Uwe Bertsch.

Für ihre absolut bedingungslose Unterstützung, ihren Rat und ihre Kritik in den letzten Jahr(zehnt)en danke ich meinen Eltern, meiner Schwester und meiner Freundin Tanja Heimerl, dem Stern des Südens, von ganzem Herzen.

